



**ÉTUDE DES ALTÉRATIONS DU CONTRÔLE CARDIORESPIRATOIRE CHEZ DES MODÈLES
OVINS DE PATHOLOGIES NÉONATALES**

Par
Stéphanie Nault, M.Sc
Programme de physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor (PhD)*
en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Juin 2020

Membres du jury d'évaluation de thèse :

Pr Jean-Paul Praud, départements de pharmacologie-physiologie et pédiatrie, faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke
Pr Ahmed Chraïbi, département de pharmacologie-physiologie, faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke
Pre Aida Bairam, département de pédiatrie, faculté de médecine, Université Laval
Pre Anne-Monique Nuyt, départements de pédiatrie et physiologie, faculté de médecine, Université de Montréal

SOMMAIRE

Introduction : L'implication des RGO dans les événements cardiorespiratoires des prématurés reste controversée. Bien que quelques études réalisées sur des animaux nouveau-nés à terme ou adultes aient montré que la stimulation des récepteurs œsophagiens entraîne des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs, l'impact d'une naissance prématurée sur ces derniers demeure inconnu. L'article 1 vise à tester l'hypothèse selon laquelle la naissance prématurée augmente l'inhibition cardiorespiratoire lors d'une stimulation œsophagienne. Le sepsis néonatal est à l'origine d'une mortalité substantielle, en partie en raison de ses conséquences sur le contrôle cardiorespiratoire. Les réponses au sepsis néonatal sont variables et peuvent expliquer un faible diagnostic pendant la phase initiale de l'infection. L'implication du sepsis néonatal sur le contrôle cardiorespiratoire reste mal connue. L'article 2 vise à comprendre davantage le lien entre l'inflammation accompagnant un sepsis néonatal et les altérations cardiaques et respiratoires.

Méthodes : Article 1. Huit agneaux nés à terme et dix agneaux nés 14 jours prématurément ont été étudiés. Une polysomnographie a été réalisée pour suivre en continu l'ECG, la respiration, la pression artérielle systémique, les stades de conscience et la saturation en O₂. Cinq stimulations de l'œsophage supérieur et/ou inférieur, incluant l'inflation rapide par ballonnet et/ou l'injection d'HCl, ont été effectuées dans un ordre aléatoire. **Article 2.** Deux polysomnographies de six heures ont été réalisées sur deux jours consécutifs chez huit agneaux. La première a été effectuée suivant une injection IV de solution saline, et la deuxième après une injection IV de 2,5 µg/kg de lipopolysaccharides (LPS). La température, les gaz du sang artériel, les stades de conscience, l'activité locomotrice, les fréquences respiratoire et cardiaque (FR et FC), la variabilité cardiaque et respiratoire (VFC et VFR), la pression artérielle systémique, les apnées et les ralentissements cardiaques ont été évalués.

Résultats : Les stimulations œsophagiennes induisent des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs (apnées, bradycardies, désaturations en oxygène) qui sont amplifiés par la naissance prématurée. L'inhibition cardiorespiratoire la plus importante est observée suite à une stimulation simultanée de l'œsophage inférieur et supérieur. L'injection de LPS induit des altérations cliniques (augmentation biphasique de la température et diminution de la mobilité et de l'éveil agité) et cardiorespiratoires (augmentation de la FR et de la FC et diminution de la VFC et de la VFR) en plus d'une inflammation du tronc cérébral.

Conclusion : La stimulation œsophagienne entraîne une augmentation des événements cardiorespiratoires chez les agneaux prématurés, probablement en raison de l'immaturité globale du système nerveux. L'injection de LPS entraîne une inflammation systémique mimant un sepsis bactérien chez les agneaux avec de multiples conséquences, y compris des altérations cardiorespiratoires.

Mots-clés : Reflux gastro-œsophagiens, prématurité, événements cardiorespiratoires, variabilité cardiorespiratoire, lipopolysaccharides, inflammation systémique.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	i
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
REMERCIEMENTS.....	x
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	1
1. PHYSIOLOGIE DU SYSTÈME CARDIORESPIRATOIRE.....	4
1.1. Contrôle nerveux de la commande ventilatoire	4
1.1.1. Voies afférentes	4
1.1.1.1. <i>Les chémorécepteurs périphériques.....</i>	<i>5</i>
1.1.1.2. <i>Les chémorécepteurs centraux.....</i>	<i>6</i>
1.1.1.3. <i>Les mécanorécepteurs bronchopulmonaires.....</i>	<i>6</i>
1.1.1.4. <i>Les mécanorécepteurs des voies aériennes supérieures</i>	<i>8</i>
1.1.1.5. <i>Les mécanorécepteurs de la paroi thoracique.....</i>	<i>9</i>
1.1.2. Centres respiratoires bulbo-pontiques.....	9
1.1.3. Efférences motrices respiratoires.....	12
1.2. Contrôle nerveux cardiovasculaire	13
1.2.1. Le système nerveux autonome.....	14
1.2.2. Le baroréflexe	14
1.2.2.1. <i>Voies afférentes.....</i>	<i>15</i>
1.2.2.2. <i>Centres régulateurs cardiovasculaires</i>	<i>15</i>
1.2.2.3. <i>Efférences motrices cardiovasculaires.....</i>	<i>16</i>
1.2.2.4. <i>Régulation nerveuse de la pression artérielle</i>	<i>18</i>
2. CONSÉQUENCES DE L'EXAGÉRATION DES RÉFLEXES CARDIORESPIRATOIRES	
INHIBITEURS PAR LA PRÉMATURITÉ ET CERTAINS FACTEURS DE RISQUE.....	19

2.1. Événements cardiorespiratoires du prématuré	19
2.1.1. Apnées-bradycardies du prématuré.....	20
2.2. Malaises sévères des nourrissons (BRUE « <i>brief resolved unexplained event</i> ») ...	22
2.3. Syndrome de mort subite du nourrisson	22
3. SEPSIS NÉONATAL	25
3.1. Définition.....	25
3.2. Réponse inflammatoire lors d'un sepsis.....	26
3.3. Sepsis, médiateurs inflammatoires, apnées et SMSN	29
3.3.1. Conséquences d'un stress postnatal (sepsis) sur les CRL.....	30
3.3.2. Sepsis néonatal et médiateurs inflammatoires.....	31
4. PHYSIOLOGIE ŒSOPHAGIENNE.....	33
4.1. Innervation.....	33
4.2. Sphincters œsophagiens	36
4.3. Récepteurs œsophagiens.....	38
4.3.1. Canaux ASIC	38
4.3.2. Canaux TRP	40
4.4. Types de récepteurs œsophagiens selon le stimulus en cause	41
4.4.1. Les mécanorécepteurs.....	41
4.4.2. Les chémorécepteurs.....	42
5. LES REFLUX GASTRO-OESOPHAGIENS	44
5.1. Mise en contexte	44
5.2. RGO et événements cardiorespiratoires en pédiatrie.....	44
6. CHÉMORÉFLEXES LARYNGÉS ET PULMONAIRES	46

6.1. Chémoréflexes laryngés.....	46
6.2. Chémoréflexe pulmonaire	47
7. VARIABILITÉ CARDIORESPIRATOIRE	48
7.1. Variabilité de la fréquence cardiaque.....	48
7.2. Variabilité de la fréquence respiratoire	50
7.3. Interrelations cardiorespiratoires.....	50
7.4. Méthode d'analyse de la variabilité cardiaque et respiratoire	52
7.4.1. Analyse de la VFC.....	52
7.4.1.1. Analyses linéaires	54
7.4.1.2. Analyses non linéaires	55
7.4.2. Analyse de la VFR.....	62
7.4.3. Analyse des interrelations cardiorespiratoires.....	63
8. PROGRAMME DE RECHERCHE DOCTORAL.....	64
8.1. Contexte et objectifs de mes projets de recherche doctoraux	64
8.1.1. Contexte et objectifs de l'article 1.....	64
8.1.2. Contexte et objectifs de l'article 2.....	65
CHAPITRE 2- RÉSULTATS OBTENUS.....	67
Article 1. Reflex cardiorespiratory events from esophageal origin are heightened by preterm birth.....	67
1.1. Avant-propos	67
1.2. Résumé de l'article 1.....	68
1.3. Article 1	69
Article 2. Cardiorespiratory alterations in a newborn ovine model of systemic inflammation induced by lipopolysaccharide injection	98

2.1. Avant-propos	98
2.2. Résumé de l'article 2.....	99
2.3. Article 2	100
CHAPITRE 3- DISCUSSION GÉNÉRALE	153
1.1. Modèle ovin pour l'étude des pathologies néonatales	153
1.2. Discussion de l'article 1.....	154
1.3. Discussion de l'article 2.....	165
1.4. Modèle de sepsis bactérien vs. modèle de sepsis viral	181
CONCLUSION GÉNÉRALE	188
PERSPECTIVES.....	189
RÉFÉRENCES	191
ANNEXES	215
Article 3. Cardiorespiratory alterations in a newborn ovine model systemic inflammation induced by polyinosinic: polycytidylic acid injection	215
1.1. Avant-propos	215
1.2. Résumé de l'article 3.....	216
1.3. Article 3	217

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Localisation des trois types de récepteurs bronchopulmonaires (nerfs afférents) dans les voies respiratoires inférieures.....	8
Figure 2. Vue parasagittale de l'organisation des centres respiratoires bulbo-pontiques du tronc cérébral chez le rat	10
Figure 3. Mécanismes du système de contrôle ventilatoire	13
Figure 4. Fonctionnement du baroréflexe artériel.....	17
Figure 5. Diagramme de Venn illustrant la théorie du triple risque du SMSN développée en 1994 par Filiano et Kinney	24
Figure 6. Signalisation des TLR4 et des TLR3.....	28
Figure 7. Mécanisme proposé de la voie de la PGE_2	32
Figure 8. Innervation de l'œsophage.....	35
Figure 9. Exemple d'extraction de la durée des cycles cardiaques (intervalles RR).....	53
Figure 10. Exemple d'un graphiphe simplifié à 5 nœuds et 5 branches.....	58
Figure 11. Représentation graphique d'une série RR.....	59
Figure 12. Graphique de visibilité horizontale associé à l'extrait de l'encadré de la figure 11.....	59
Figure 13. Graphique en réseau illustrant l'analyse de visibilité horizontale.....	60
Figure 14. Graphique de visibilité verticale associé à l'extrait de l'encadré de la figure 11.....	61
Figure 15. Exemple de signaux obtenus par pléthysmographie respiratoire par inductance du thorax et de l'abdomen.....	62
Figure 16. Extraction des trois séries temporelles du signal RESP.....	63

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>ALTE</i>	<i>Apparent life-threatening event</i>
<i>ASIC</i>	<i>Acid-sensing ion channel</i>
<i>BRUE</i>	<i>Brief resolved unexplained event</i>
CRL	Chémoréflexes laryngés
ECG	Électrocardiogramme
EOS	<i>Early-onset sepsis</i>
FC	Fréquence cardiaque
f_R	Fréquence respiratoire
<i>HF</i>	<i>High frequency</i>
H-MD	Profondeur moyenne horizontale
<i>LF</i>	<i>Low frequency</i>
LPS	Lipopolysaccharides
<i>LOS</i>	<i>Late-onset sepsis</i>
<i>NREM</i>	<i>Non rapid eye movement</i>
NTS	Noyau du tractus solitaire
PA	Pression artérielle
$PaCO_2$	Pression partielle artérielle de gaz carbonique
<i>PAMPs</i>	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PaO_2	Pression partielle artérielle d'oxygène
PGE_2	Prostaglandine E_2
Poly I:C	Acide polyinosinique-polycytidylique
TLR	Récepteur de type Toll
<i>REM</i>	<i>Rapid eye movement</i>
RGO	Reflux gastro-œsophagien
<i>rMSSD</i>	<i>Square root of the mean squared differences of successive RR intervals</i>
SD1	Coefficient de variabilité à court terme
SD2	Coefficient de variabilité à long terme
SIO	Sphincter inférieur de l'œsophage
SMSN	Syndrome de mort subite du nourrisson
SpO_2	Saturation artérielle de l'hémoglobine en oxygène
SSO	Sphincter supérieur de l'œsophage
T_e	Temps expiratoire
T_i	Temps inspiratoire
T_{tot}	Durée totale du cycle respiratoire
<i>TRP</i>	<i>Transient receptor potential cation channel</i>

<i>TRPA1</i>	<i>Transient receptor potential cation channel, ankyrin subfamily member 1</i>
<i>TRPV1</i>	<i>Transient receptor potential cation channel, vanilloid subfamily member 1</i>
VFC	Variabilité de la fréquence cardiaque
VFR	Variabilité de la fréquence respiratoire
V-MD	Profondeur moyenne verticale

À mes parents, mes super-héros

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier le programme de formation de bourse de doctorat du **Fonds de recherche du Québec – Santé** (FRQ-S), pour l’octroi de ma bourse.

J’exprime toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche, Pr **Jean-Paul Praud**, de m’avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire. Je te remercie sincèrement pour ta grande disponibilité, ton dévouement, ta confiance, ton soutien et tes précieux conseils qui ont permis d’accroître mes connaissances scientifiques durant toutes ces années. Merci d’avoir été un mentor hors pair et de m’avoir guidé tout au long de mon parcours académique.

Je remercie grandement les membres du jury, les Prs **Ahmed Chraïbi**, **Aida Bairam** et **Anne-Monique Nuyt**, pour l’évaluation de cette thèse et votre expertise.

Merci infiniment aux Prs **Sophie Tremblay**, **Patrick Pladys**, **Guy Carrault** et **Djamal Djeddi** pour votre collaboration, vos conseils et votre expertise dans la réalisation des publications scientifiques. Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous et une expérience enrichissante.

Mes remerciements vont également aux membres de mon comité d’encadrement au doctorat, les Prs **Alain Frigon** et **François Corbin**, pour vos judicieux conseils durant mon cheminement académique.

Mes sincères remerciements à mes collègues et amis. Merci à notre assistante de recherche, **Nathalie Samson**, pour tout le temps consacré et tes nombreux conseils. Merci à **Charlène Nadeau**, une technicienne en santé animal extraordinaire. Charlène, merci pour ton aide technique mais, surtout, pour les nombreuses heures passées ensemble durant les enregistrements dans la noiceur totale à se raconter des histoires. Merci à tous les étudiants du laboratoire que j’ai eu la chance de côtoyer : **Michaël Sage**, **Danny Cantin**, **Sally Al-Omar**, **Christophe Morin**, **Charles Alain** et **Wendy See**. Sans vous, mon parcours n’aurait certainement pas été aussi plaisant et les 5 à 7 margaritas party n’aurait pas été les mêmes.

Finalement, j’adresse toute ma gratitude à mes parents, **Manon** et **Yves**, que j’aime énormément, pour votre soutien inestimable, votre grande écoute et vos encouragements sans faille tout au long de mon cheminement. Sans votre soutien, la réalisation de cette thèse n’aurait pu être possible. Merci infiniment à mon conjoint, **Michaël**, de croire en moi, de me pousser à me surpasser et de ne jamais cesser de m’encourager. Merci à ma marraine, **Josée**, mon frère, **Steve**, mes grands-parents, **Lucille** et **Maurice** et mes merveilleuses amies, **Vanessa**, **Mélodie** et **Valérie**. Vous avez tous cru en moi du début à la fin et vous n’avez jamais cessé de m’encourager même durant les périodes plus difficiles. Je suis extrêmement choyée d’être entourée de personnes si formidables, je vous aime.

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

La physiopathologie des apnées et bradycardies en période néonatale, qui sont impliquées dans des pathologies telles que les événements cardiorespiratoires des prématurés, les malaises sévères et le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN), reste encore mal connue. Le modèle ovin est particulièrement pertinent pour étudier des situations mimant des pathologies néonatales fréquentes et parfois dramatiques, connues pour générer des événements cardiorespiratoires, mais dont la physiopathologie n'est pas encore complètement élucidée. C'est ainsi que mes études doctorales s'inscrivent dans le cadre du programme de recherche du laboratoire depuis plus de 30 ans, cherchant à mieux comprendre ces pathologies en employant des modèles ovins néonataux uniques qui miment du mieux possible les situations cliniques rencontrées chez les nouveau-nés humains (prématurité et sepsis néonatal).

Des études antérieures suggèrent que, bien que généralement sans conséquence délétère, les reflux gastro-œsophagiens (RGO) peuvent entraîner des événements cardiorespiratoires réflexes (apnées, bradycardies, hypoxémie) en période néonatale. Ces événements réflexes ont été impliqués dans certains cas d'apnées-bradycardies du prématuré, de malaises sévères et de mort subite du nourrisson. Il est généralement accepté, dans la littérature, que la stimulation des récepteurs laryngés, suite à un reflux laryngopharyngé, peut être en cause dans ces réflexes (Praud, 2010). Par contre, l'implication possible d'un reflux gastro-œsophagien qui ne remonte pas jusqu'au larynx fait toujours l'objet de controverse (Poets et Brockmann, 2011; Abu Jawdeh et Martin, 2013). Des études physiologiques effectuées principalement chez l'animal adulte anesthésié ont montré que la stimulation de chémorécepteurs et/ou de mécanorécepteurs de la paroi œsophagienne génère des messages afférents vagues à l'origine de réflexes cardiorespiratoires. Malgré quelques résultats chez l'animal néonatal (Schey et al., 1981; Jeffery et al., 1995; McKelvey et al., 2001) et l'humain nouveau-né (Ramet et al., 1990; Ramet, 1994; Wenzl et al., 2001; Corvaglia et al., 2009; Nunez et al., 2011; Nobile et al., 2019), il reste beaucoup d'inconnues sur ces réflexes

en période néonatale. J'ai préalablement mis au point, lors de mes études de maitrise, un modèle ovin à terme mimant la stimulation des récepteurs œsophagiens par un RGO. J'ai montré que la stimulation des récepteurs œsophagiens entraîne des réflexes associant éveil, toux, fermeture laryngée, ralentissements cardiaques et courtes apnées chez l'agneau né à terme, en santé et non anesthésié. Ma première étude doctorale (**article 1**) a permis de comparer les résultats obtenus préalablement chez l'agneau à terme avec notre modèle unique d'agneau prématuré dont les événements cardiorespiratoires réflexes ont été aggravés en raison d'une immaturité globale du système nerveux (Nault et al., 2017).

Dans le même ordre d'idées, le sepsis néonatal demeure un problème majeur, notamment en raison de ses conséquences sur le contrôle cardiorespiratoire. Ce dernier se manifeste par des événements cardiorespiratoires sévères à l'origine d'une morbidité et mortalité substantielles chez le nouveau-né, en particulier chez le prématuré présentant un sepsis d'apparition tardive (« *late onset sepsis* », LOS) (Hofstetter et al., 2008; Mayr et al., 2014; Dong et Speer, 2015; Singer et al., 2016; Shane et al., 2017). Hormis la prévention, le principal défi de ces infections est leur détection précoce et la reconnaissance de la cause bactérienne ou virale afin d'instituer rapidement un traitement approprié. Cliniquement, les apnées-bradycardies sévères sont souvent révélatrices du LOS et sont potentiellement impliquées dans des cas de malaises sévères et de SMSN durant les 4-6 premières semaines de vie chez les nouveau-nés à terme ou chez les prématurés (avant un âge corrigé de 4 à 6 semaines) (Blood-Siegfried, 2009; Moscovis et al., 2015). Toutefois, le lien entre sepsis néonatal, inflammation et altération de l'activité cardiaque et respiratoire reste encore mal compris. Mes deux autres études doctorales (**article 2 et article 3**) ont permis de caractériser davantage ce lien chez un modèle ovin nouveau-né, physiologiquement proche du nouveau-né humain. Plus précisément, des altérations de l'activité cardiaque et respiratoire accompagnées de manifestations cliniques ont été observées lorsqu'une inflammation systémique reliée à un sepsis bactérien est mimée chez l'agneau nouveau-né. Il est à noter que seul l'article 2 portant sur le modèle ovin d'inflammation systémique reliée à un sepsis bactérien sera présenté dans cette thèse. L'article 3 portant sur le modèle ovin d'inflammation systémique reliée à un sepsis

viral sera, quant à lui, présenté en annexe, puisque le manuscrit n'est pas encore soumis à ce jour. Toutefois, une comparaison entre les deux modèles (sepsis bactérien vs. sepsis viral) sera présentée dans la dernière partie de la discussion de ma thèse.

Mes études doctorales permettront une meilleure compréhension du lien entre les réflexes inhibiteurs des fonctions cardiaque et respiratoire et des pathologies néonatales fréquentes dans le but premier d'améliorer la prise en charge des apnées-bradycardies des nouveau-nés et des prématurés. De plus, les études sur le sepsis néonatal pourraient aider les cliniciens à la détection précoce d'un LOS et permettre d'éviter la progression vers des complications potentiellement mortelles.

1. PHYSIOLOGIE DU SYSTÈME CARDIORESPIRATOIRE

Il est important de bien connaître le fonctionnement du contrôle cardiorespiratoire pour mieux comprendre les mécanismes en jeu dans les anomalies du contrôle respiratoire et/ou cardiovasculaire secondaires à diverses pathologies néonatales. Les grandeurs physiologiques caractéristiques des fonctions cardiovasculaire et respiratoire sont soumises à une régulation via deux composants, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire. Ces deux appareils interagissent afin d'assurer une oxygénation optimale aux cellules de l'organisme. Plus précisément, l'appareil respiratoire assure la ventilation et les échanges gazeux dans les alvéoles pulmonaires, alors que l'appareil cardiovasculaire assure la circulation sanguine et l'irrigation (Thayer et al., 2011). Seul le contrôle nerveux autonome du système cardiorespiratoire sera abordé dans cette thèse.

1.1. Contrôle nerveux de la commande ventilatoire

Les circuits neuronaux responsables de la génération et de la régulation du rythme et du patron respiratoire eupnéique sont situés dans le tronc cérébral au niveau des centres respiratoires bulbo-pontiques (Stojanovska et al., 2018). Ainsi, les muscles inspiratoires et expiratoires, qui sont en fait des muscles squelettiques, se contractent sous l'effet de la commande nerveuse dictée par les centres respiratoires. Le contrôle des muscles ventilatoires est vital afin d'assurer une ventilation alvéolaire adéquate (P_{aO_2} et P_{aCO_2}), de répondre aux besoins métaboliques (VO_2 et VCO_2) et, surtout, de réguler les gaz sanguins (P_{aO_2} et P_{aCO_2}) et le pH artériel (pH_a) (Guyton et Hall, 2003).

1.1.1. Voies afférentes

Afin de maintenir l'homéostasie, les centres bulbo-pontiques sont perpétuellement influencés par des signaux provenant de récepteurs. On y retrouve les afférences provenant des chémorécepteurs (périphériques et centraux), et les afférences provenant des mécanorécepteurs (récepteurs thoraco-pulmonaires et des voies aériennes supérieures) (Raux et al., 2007).

1.1.1.1. Les chémorécepteurs périphériques

Les chémorécepteurs périphériques sont sensibles aux changements de P_{aO_2} , P_{aCO_2} et pH_a . Ils sont les principaux acteurs dans la réponse à l'hypoxie alors qu'ils ne sont responsables en moyenne que de 30% de la réponse à l'hypercapnie (Despas, 2006); ce pourcentage varie selon les espèces mammifères étudiées (Pan et al., 1995; Rodman et al., 2001; Izumizaki et al., 2004; Dumont et Kinkead, 2010). Il existe deux types de chémorécepteurs périphériques caractérisés selon leur localisation: les glomus carotidiens situés bilatéralement au niveau de la bifurcation carotidienne (= chémorécepteurs carotidiens), et les glomus aortiques situés au niveau de la crosse de l'aorte (= chémorécepteurs aortiques) (Despas, 2006; Raux et al., 2007; Carrol et Kim, 2013).

Les chémorécepteurs carotidiens

Le glomus (ou corpuscule) carotidien est composé de cellules sensibles aux gaz sanguins (= chémosenseurs), les cellules glomiques de type 1. Les cellules glomiques de type 1 secrètent de nombreux médiateurs (en particulier acétylcholine et ATP) qui stimulent les terminaisons périphériques du nerf sinusal dont les fibres afférentes projettent au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) (par l'intermédiaire du nerf sinusal qui rejoint le nerf glosso-pharyngien) (Despas, 2006). Le nerf sinusal possède une activité de base très importante : les oscillations de ses influx sont simultanées aux oscillations de P_{aO_2} et P_{aCO_2} . En d'autres termes, ce contrôle, même en normoxie, permet d'assurer la stabilité des gaz sanguins artériels (Guyton et Hall, 2003).

Les chémorécepteurs aortiques

Les corps para-aortiques sont situés le long de la crosse de l'aorte. Leurs fibres nerveuses afférentes constituent le nerf aortique, puis le nerf vague avant de se rendre au NTS. Ils sont mis en jeu uniquement lors d'un déficit fonctionnel chronique des glomus carotidiens (ex. ablation glomique), ils jouent donc un rôle moindre dans le contrôle ventilatoire (Despas, 2006).

1.1.1.2. Les chémorécepteurs centraux

Les chémorécepteurs centraux sont sensibles aux variations de $P_a\text{CO}_2$ (approximativement 70% de la réponse selon les espèces) et de pH du liquide céphalorachidien. Leurs afférences prennent surtout naissance bilatéralement au niveau de la face ventrolatérale du bulbe (Raux et al., 2007). Cependant, il n'y pas de site unique pour la détection du CO_2 , mais plutôt de nombreuses structures chémosensibles au niveau du tronc cérébral, incluant, entre autres, les noyaux du raphé (Darnall, 2010).

1.1.1.3. Les mécanorécepteurs bronchopulmonaires

Un schéma récapitulatif des trois différents types de récepteurs bronchopulmonaires est présenté à la Figure 1. Parmi les récepteurs bronchopulmonaires, on retrouve les **récepteurs à adaptation rapide** qui correspondent à des terminaisons nerveuses libres dans la muqueuse de la trachée, des bronches et les voies aériennes supérieures (Lang et al., 2001). Leurs fibres afférentes myélinisées $A\delta$ de petit calibre cheminent dans le nerf vague. Ils répondent à la distension rapide des poumons et sont aussi chimiquement sensibles, ce qui fait d'eux des récepteurs à l'irritation. Les récepteurs à adaptation rapide sont ainsi impliqués dans la bronchoconstriction, la sécrétion du mucus et le réflexe de toux en réponse à des irritants physiques ou chimiques (Barnes, 2012). Ce réflexe de défense est particulièrement important lorsque la trachée ou les bronches sont en contact avec un irritant tel que la fumée des cigarettes, la poussière et les toxines environnementales (Bailey et Fregosi, 2006, Barnes 2012).

Les **récepteurs à adaptation lente** correspondent à des terminaisons nerveuses au niveau des fibres musculaires lisses de la trachée et des bronches (Barnes, 2012). Leurs fibres afférentes myélinisées de grand calibre cheminent aussi dans le nerf vague (Lang et al., 2001). Ces récepteurs à l'étirement répondent à la distension lente des poumons et sont chimiquement insensibles. Ils sont sensibles aux variations de pression transpulmonaire et donc à l'inflation pulmonaire et participent au réflexe de Hering-Breuer (Bailey et Fregosi, 2006). Le réflexe inhibiteur de l'inspiration de Hering-Breuer est impliqué dans la transition inspiration/expiration *via* le contrôle du volume pulmonaire. Au cours de l'inspiration, les

messages afférents provenant de la stimulation des récepteurs bronchopulmonaires à adaptation lente et cheminant par le nerf vague inhibent l'inspiration au niveau des centres respiratoires bulbaires. Ce réflexe permet de terminer l'inspiration et d'éviter des lésions pulmonaires liées à l'inflation exagérée; c'est donc un réflexe protecteur des poumons (Bailey et Fregosi, 2006; Vadhan et Tadi, 2020).

Les **terminaisons des fibres C** comprennent les fibres C bronchiques (muqueuse de la trachée et des bronches) et pulmonaires (parenchyme juxta-alvéolaire) (Bailey et Fregosi, 2006). Les fibres afférentes C non myélinisées à conduction lente sont aussi contenues dans le nerf vague. Les fibres C bronchiques sont sensibles aux agents irritants, à la distension et participent aussi aux réflexes de défense (ex. toux). Les fibres C pulmonaires sont stimulées par la congestion pulmonaire (par exemple, lors de l'œdème pulmonaire ou de l'exercice) et responsables du chémoréflexe pulmonaire lors de l'injection de capsaïcine (Diaz et al., 1999; Aubier, 2009). La capsaïcine est le composé actif du piment fort. Ce dernier est surtout connu en alimentation pour son goût épicé et piquant, c'est la capsaïcine qui, en contact avec les muqueuses, procure cette sensation de brûlure (Buck et Burks, 1986). En clinique, bien que la capsaïcine soit utilisée, entre autres, dans certaines crèmes topiques pour le soulagement de la douleur neuropathique périphérique telle que l'arthrose, elle n'est pas usage courant (Besson et al., 2008). En revanche, l'injection systémique par voie sous-cutanée de doses élevées de capsaïcine a couramment été utilisée chez les petits rongeurs (les rats, les lapins et les cobayes) (Buck et Burks, 1986) et les agneaux (Diaz et al., 1999; Nault et al., 2017) afin de bloquer les fibres C dans divers organes et d'étudier leur rôle dans différentes conditions expérimentales (Buck et Burks, 1986). De plus, l'injection systémique par voie intraveineuse de faibles doses de capsaïcine stimule les terminaisons des fibres C et permet l'induction d'un chémoréflexe pulmonaire (Coleridge et Coleridge, 1994) (la section 6.2. de cette thèse est réservée au chémoréflexe pulmonaire).

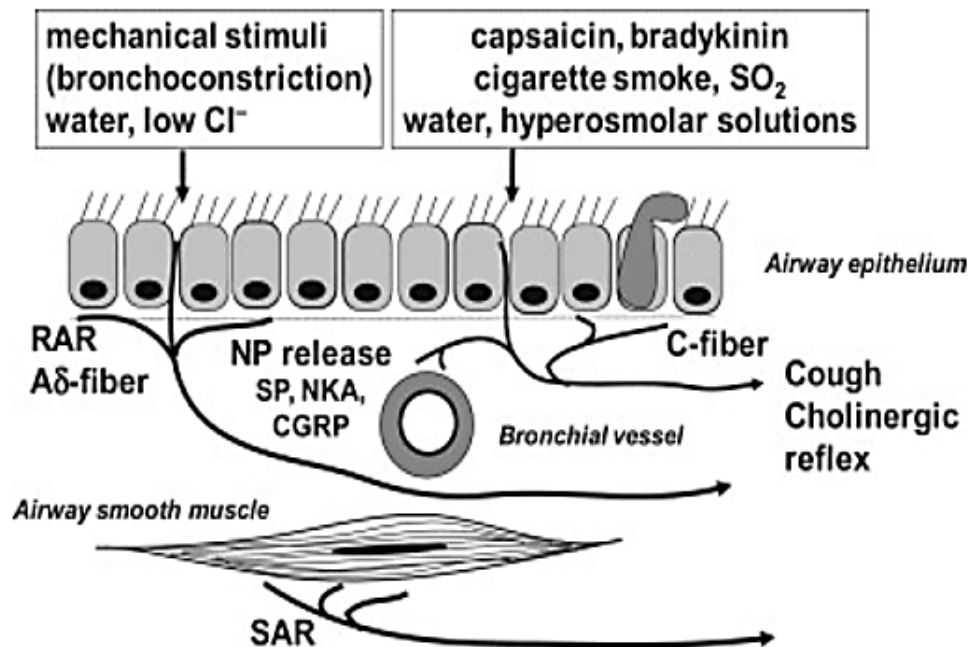


Figure 1. Localisation des trois types de récepteurs bronchopulmonaires (nerfs afférents) dans les voies respiratoires inférieures. Les récepteurs à adaptation lente sont présents dans le muscle lisse des voies respiratoires, tandis que les récepteurs à adaptation rapide et les fibres C sont présents dans la muqueuse des voies respiratoires. NP, neuropeptide; SP, substance P; NKA, neurokinine A; CGRP, peptide lié au gène de la calcitonine. Figure de Barnes, 2012 avec autorisation de reproduction de *Primer on the Autonomic Nervous System*.

1.1.1.4. Les mécanorécepteurs des voies aériennes supérieures

Au niveau des voies aériennes supérieures, on retrouve des récepteurs de divers types : sensibles à l'irritation, aux modifications de pression ou de débit. Les afférences sont transmises *via* les nerfs vague, glossopharyngien, grand hypoglosse et trijumeau. Entre autres, les récepteurs nasaux, innervés par le nerf trijumeau, sont des récepteurs à l'irritation et sont sensibles aux stimuli chimiques, mécaniques, au froid et aux molécules inflammatoires. La majorité des récepteurs des voies aériennes supérieures sont disséminés au niveau du larynx (innervés par le nerf laryngé supérieur, branche du nerf vague) où l'on retrouve des mécanorécepteurs sensibles au froid, à la pression et aux mouvements et des chémorécepteurs participant aux chémoréflexes laryngés (CRL) (St-Hilaire et al., 2005; Reix et al., 2007).

1.1.1.5. Les mécanorécepteurs de la paroi thoracique

D'une part, la paroi thoracique est composée d'une structure osseuse et cartilagineuse et, d'autre part, des muscles impliqués dans la respiration. Ces muscles thoraciques possèdent une fonction mixte, c'est-à-dire respiratoire et posturale. Les récepteurs des muscles thoraciques participent au réflexe myotatique (activité tonique) qui permet la surveillance permanent de l'état d'étirement des fibres musculaires en fonction du volume pulmonaire, de la position corporelle et de l'implication des muscles respiratoires autre que dans la respiration (Aubier, 2009).

1.1.2. Centres respiratoires bulbo-pontiques

La commande ventilatoire prend sa source au sein d'un réseau de neurones du tronc cérébral situé dans le bulbe rachidien et le pont (centres bulbo-pontiques). Bien que ces centres respiratoires soient modulés *via* des messages sensitifs afférents provenant des chémorécepteurs et des mécanorécepteurs, ils reçoivent également des influences d'origine corticale (contrôle volontaire), sous-corticale (hypothalamus, cervelet) et endocrinienne (adrénaline, progestérone). Les centres bulbo-pontiques sont divisés en trois grandes concentrations de neurones: 1) un groupe respiratoire dorsal; 2) une colonne respiratoire ventrale; 3) un groupe respiratoire pontique (Alheid et McCrimmon, 2008). L'emplacement des centres respiratoires est schématisé dans la figure 2.

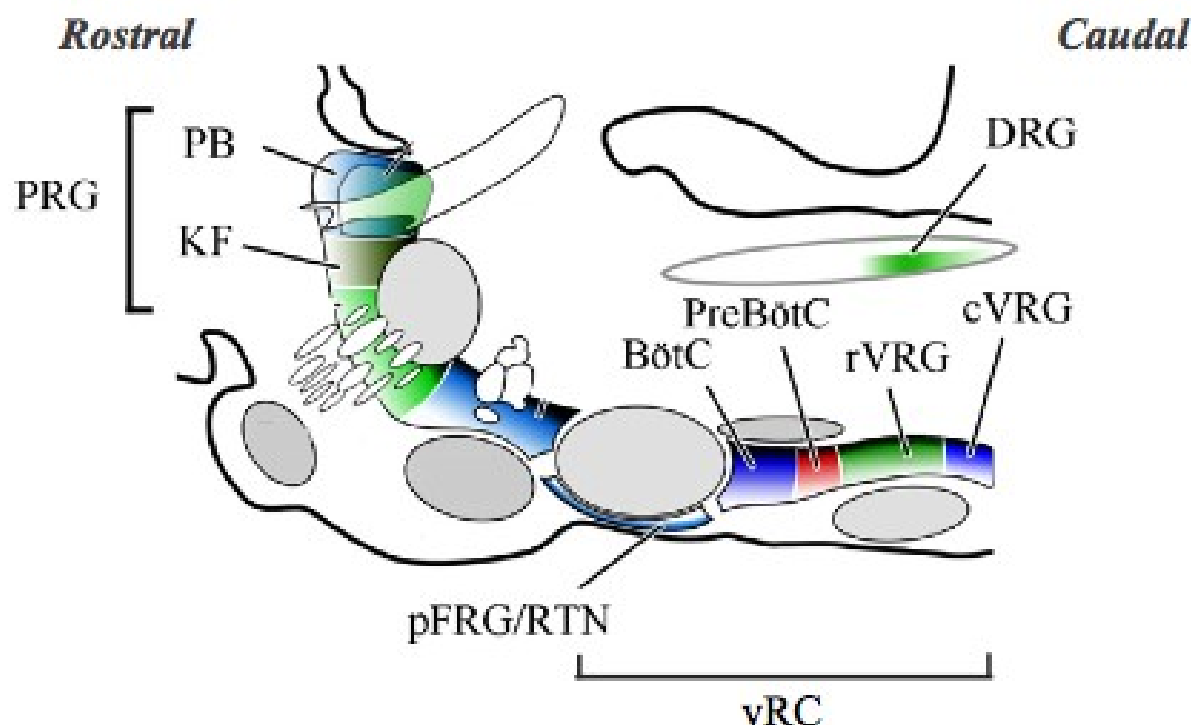


Figure 2. Vue parasagittale de l'organisation des centres respiratoires bulbo-pontiques du tronc cérébral chez le rat. BötC, complexe de Bötzinger; cVRG, partie caudale du groupe respiratoire ventral; DRG, groupe respiratoire dorsal; KF, noyau de Kölliker-Fuse; PB, complexe parabrachial; pFRG/RTN, groupe respiratoire parafacial/noyau rétrotrapézoïde; preBötC, complexe de préBötzinger; PRG, groupe respiratoire pontique; rVRG, partie rostrale du groupe respiratoire ventral; vRC, colonne respiratoire ventrale. Figure adaptée d'Alheid et McCrimmon, 2008 avec autorisation de reproduction de *Respiratory Physiology & Neurobiology*.

Le groupe respiratoire dorsal : il est situé dans la partie dorsale du bulbe rachidien et semble être impliqué dans l'inspiration. En fait, il s'agit surtout d'un centre d'intégration et de modifications des multiples afférences qui proviennent de la périphérie. Les neurones du groupe respiratoire dorsal sont majoritairement situés dans la portion caudale du NTS qui constitue la terminaison sensitive du nerf vague et du nerf glossopharyngien. Le NTS reçoit toutes les afférences provenant des récepteurs bronchopulmonaires et des chémorécepteurs périphériques et centraux, dont il constitue le premier relais synaptique (Pascual-Font et al., 2011). Une fois intégrées au niveau du NTS, les informations sont acheminées vers la colonne respiratoire ventrale où des groupes de neurones dictent le rythme respiratoire (Guyenet et Bayliss, 2015).

La colonne respiratoire ventrale : elle est située dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien, est responsable de l'expiration ou l'inspiration, selon le type de neurones stimulés. Elle comprend, entre autres, trois groupes de neurones en réseau générateurs du rythme respiratoire de base à trois temps i) le complexe de préBötzinger responsable de la phase inspiratoire; ii) le complexe post-inspiratoire responsable de la phase post-inspiratoire et iii) le groupe respiratoire parafacial (pFRG) responsable de la phase expiratoire (Anderson et Ramirez, 2017).

Les groupes de neurones de la colonne respiratoire ventrale sont organisés de la région caudale à rostrale comme suit : 1) groupe respiratoire ventral caudal; 2) groupe respiratoire ventral rostral; 3) complexe de préBötzinger; 4) complexe de Bötzing; 5) noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial. Le groupe respiratoire ventral caudal contient surtout des neurones bulbosпинаux expiratoires prémoteurs qui commandent les motoneurones des muscles expiratoires. Le groupe respiratoire ventral rostral contient surtout des neurones bulbosпинаux inspiratoires prémoteurs qui commandent les motoneurones des muscles inspiratoires (Guyton et Hall, 2003; Alheid et McCrimmon, 2008). Le complexe de préBötzinger possède des neurones à activité pacemaker qui génèrent le rythme inspiratoire et sont initiateurs de la respiration (interneurones activent les neurones inspiratoires du groupe respiratoire ventral rostral). Le complexe post-inspiratoire (localisé de façon rostrale au complexe de préBötzinger et dorsomédiale au noyau ambigu), a récemment été identifié comme générateur du rythme post-inspiratoire (une sous-composante motrice de l'expiration) *via* des mécanismes similaires à ceux du complexe de préBötzinger (Anderson et Ramirez, 2017). Le complexe de Bötzing contient principalement des neurones expiratoires inhibiteurs nécessaires à la transition inspiration-expiration lors de la respiration de base (interneurones activent les neurones inspiratoires du groupe respiratoire ventral caudal). Le noyau rétrotrapézoïde/groupe respiratoire parafacial, et plus particulièrement le groupe respiratoire parafacial, contient le noyau parafacial latéral responsable de la génèse expiratoire active (ex. durant l'exercice). Le noyau rétrotrapézoïde, quand à lui, serait plutôt impliqué dans la réponse des centres respiratoires au CO₂ / pH (Anderson et Ramirez, 2017; Stojanovska et al., 2018).

Le groupe respiratoire pontique : il est situé dans la région latérodorsale du pont et est composé du noyau Kölliker-Fuse et du complexe parabrachial médian. Le groupe respiratoire pontique permet la transition harmonieuse entre l'inspiration et l'expiration (Morschel et Dutschmann, 2009; Poon et Song, 2014). En effet, il est connu pour jouer un rôle en tant qu'interrupteur inspiratoire lors de la phase de transition inspiratoire-expiratoire (Poon et Song, 2014).

1.1.3. Efférences motrices respiratoires

Les voies efférentes comportent des motoneurones commandés *via* les centres respiratoires et qui sont responsables de la contraction des muscles respiratoires. Les motoneurones spinaux innervent les muscles respiratoires alors que les motoneurones des nerfs crâniens, situés dans le bulbe assurent la commande motrice vers les muscles des voies aériennes supérieures (Monteau et Hilaire, 1991). Un résumé du système de contrôle ventilatoire est schématisé dans la figure 3.

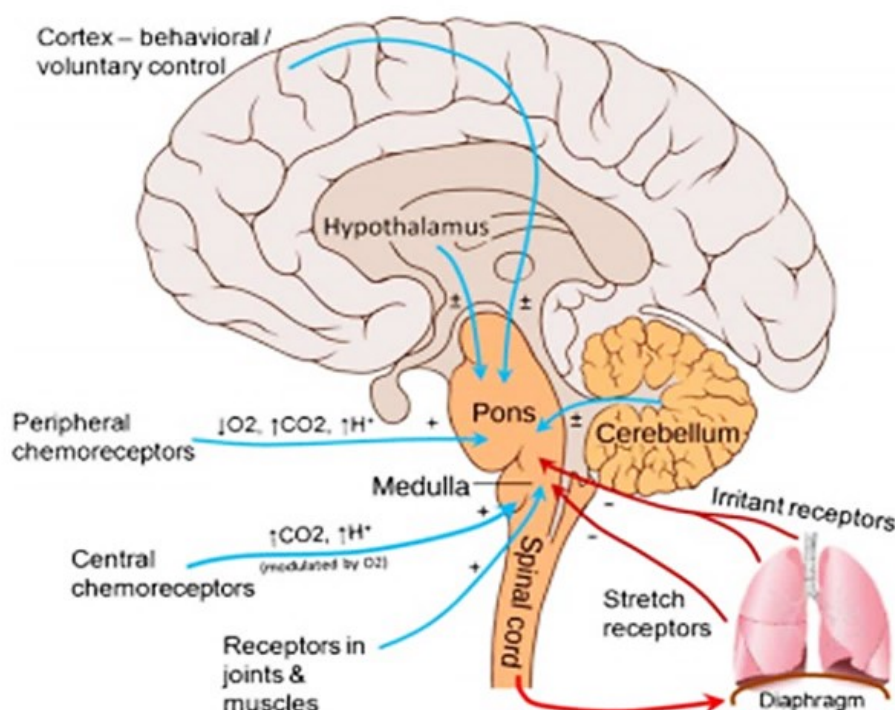


Figure 3. Mécanismes du système de contrôle ventilatoire. Les centres bulbo-pontiques sont constamment influencés par des signaux provenant de récepteurs situés au niveau de l'appareil respiratoire (chémorecepteurs périphériques et centraux et mécanorécepteurs) et du cerveau qui régulent la ventilation. Figure de Carroll et Agarwal, 2010 avec autorisation de reproduction de *Paediatric Respiratory Reviews*.

1.2. Contrôle nerveux cardiovasculaire

Le rôle des centres cardiovasculaires est, entre autres, de réguler la pression artérielle (PA) systémique afin d'assurer un débit sanguin optimal aux organes. La PA, étant la force exercée par le sang sur la paroi des artères, est indispensable puisqu'elle permet de maintenir les parois du système artériel distendues et d'assurer l'écoulement du sang (Guyton et Hall, 2003). Elle est constamment régulée par divers mécanismes de contrôle nerveux et/ou hormonaux (ex. système rénine-angiotensine, variations du tonus veineux, facteurs endothéliaux, échanges liquidiens, régulation rénale) dont le délai d'action varie de quelques secondes à quelques heures. Seule la régulation nerveuse immédiate de la pression artérielle sera présentée dans cette thèse. Le baroréflexe est le réflexe physiologique du système nerveux autonome permettant de réguler rapidement la PA.

1.2.1. Le système nerveux autonome

Le cœur est un muscle automatique possédant la capacité phénoménale à se contracter de manière cyclique tout au long de notre vie. Ce sont les fibres autorythmiques du cœur qui lui confèrent cette capacité. En effet, ces fibres génèrent spontanément des potentiels d'action qui initient les contractions cardiaques. Le nœud sino-auriculaire et le nœud auriculo-ventriculaire sont les deux stimulateurs (= pacemakers) internes dont la dépolarisation commande le rythme cardiaque (Shaffer et Venner, 2013).

Le système nerveux autonome est composé du système sympathique et parasympathique. Au niveau du contrôle sympathique, les nerfs cardiaques sympathiques innervent le nœud sino-auriculaire, le nœud auriculo-ventriculaire et le muscle cardiaque (myocarde) (Shaffer et Venner, 2013). Lors d'un potentiel d'action, il y a libération et liaison de norépinephrine et d'épinéphrine aux récepteurs bêta-adrénérgiques (β_1) situés sur les fibres cardiaques musculaires (cardiomyocytes). Ceci accélère la dépolarisation des nœuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire (augmentation de la FC) et renforce la contractilité des oreillettes et des ventricules (Shaffer et Venner, 2013). Au niveau parasympathique, les nerfs vagues parasympathiques innervent le nœud sino-auriculaire, le nœud auriculo-ventriculaire et le muscle cardiaque auriculaire. La stimulation de ces motoneurones au détriment des nerfs sympathiques entraîne la libération et la liaison d'acétylcholine aux récepteurs muscariniques (surtout M2). Ceci diminue la fréquence de dépolarisation dans les nœuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire (ralentissement de la FC). Le tonus vagal affecte à peine la contractilité ventriculaire en raison d'une innervation vagale faible (Shaffer et Venner, 2013).

1.2.2. Le baroréflexe

Le baroréflexe est un réflexe physiologique permettant de limiter les brusques fluctuations de la PA (pression qu'exerce le sang dans les vaisseaux sanguins). Ce baroréflexe repose sur des récepteurs (= barorécepteurs) sensibles à l'étirement de la paroi des vaisseaux sanguins (Kaur et al., 2016). Ces barorécepteurs carotidiens et aortiques envoient aux centres régulateurs cardiovasculaires des informations relatives aux variations de la PA grâce à une modulation

des afférences nerveuses autonomes sympathiques et parasympathiques (Kaur et al., 2016). Le fonctionnement de l'arc baroréflexe est brièvement présenté à la figure 4.

1.2.2.1. Voies afférentes

Les afférences du baroréflexe possèdent deux provenances, soit les récepteurs du système à haute pression ou à basse pression. **Les barorécepteurs artériels du système à haute pression**, localisés dans la paroi de la crosse aortique et du sinus carotidien, sont sensibles à l'étirement, ils s'assurent que la PA demeure dans la zone des valeurs physiologiques. Les barorécepteurs aortiques et carotidiens acheminent les informations au NTS, respectivement *via* le nerf aortique (ou nerf de Ludwig-Cyon) qui rejoint le nerf vague et *via* le nerf de Hering qui rejoint le nerf glossopharyngien. **Les barorécepteurs cardiopulmonaires du système à basse pression**, localisés dans les parois de l'oreillette droite, la veine cave et les poumons, sont sensibles aux variations de pression atrio-ventriculaire et émettent des projections dans le nerf vague. Ils sont moins importants dans la régulation de la PA (Guyenet, 2006; Freet et al., 2013; Kaur et al., 2016).

1.2.2.2. Centres régulateurs cardiovasculaires

Les centres cardiovasculaires du tronc cérébral (pont et bulbe rachidien) reçoivent les informations. Ces dernières sont intégrées dans le NTS, qui constitue le premier relais synaptique (Kaur et al., 2016). Les neurones du NTS établissent un deuxième relai synaptique sur deux centres régulateurs du système nerveux autonome, soit le centre vasomoteur sympathique (cardio-accélérateur) et le centre cardio-inhibiteur parasympathique. Pour la voie sympathique du centre vasomoteur, l'influx intégré au NTS est transmis dans le bulbe rachidien ventrolatéral caudal *via* des neurones glutamatergiques puis au bulbe rachidien ventrolatéral rostral *via* des neurones GABAergiques. Pour la voie parasympathique du centre cardio-inhibiteur, l'influx est transmis du NTS au noyau ambigu *via* des neurones glutamatergiques (Guyenet, 2006; Thomas, 2011 ; Kaur et al., 2016).

1.2.2.3. Efférences motrices cardiovasculaires

La voie sympathique contenant les neurones excitateurs issus du centre vasomoteur descend dans le faisceau bulbospinal puis la corne intermédiolatérale de la moelle épinière. Ces neurones y font synapse avec des neurones pré-ganglionnaires au niveau dorsolombaire. Ces derniers activent les neurones post-ganglionnaires par la libération d'acétylcholine au niveau des ganglions de la chaîne sympathique (Kaur et al., 2016). Les effecteurs qui reçoivent les efférences sont le tissu nodal, le myocarde, l'appareil juxta-glomérulaire et la médullosurrénale. Le neurotransmetteur impliqué est la noradrénaline. Pour la voie parasympathique du centre cardio-inhibiteur, les efférences motrices du noyau ambigu et du noyau dorsal moteur du vague cheminent dans le nerf vague et les neurones parasympathiques post-ganglionnaires jusqu'aux effecteurs (tissu nodal, oreillettes et vaisseaux). Le neurotransmetteur impliqué est l'acétylcholine (Guyenet, 2006).

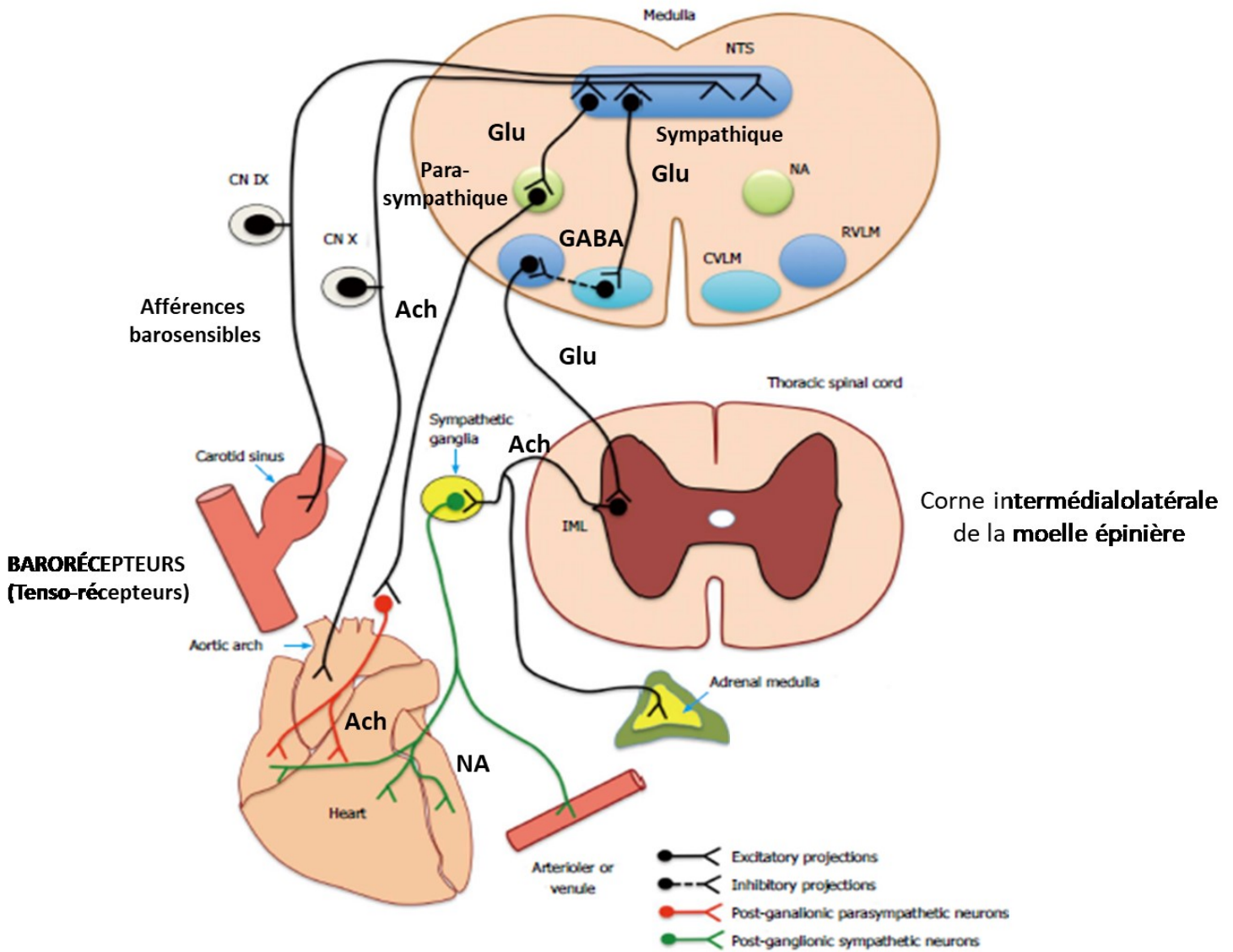


Figure 4. Fonctionnement du baroréflexe. Une fois stimulés, les barorécepteurs de la crosse aortique et du sinus carotidien transmettent des messages afférents vers le bulbe rachidien qui, lui, retourne des messages efférents sympathiques et parasympathiques aux tissus effecteurs. IX, nerf glossopharyngien; X, nerf vague; NTS, noyau du tractus solitaire; NA, noyau ambigu; CVLM, bulbe rachidien ventrolatéral caudal; RVLM, bulbe rachidien ventrolatéral rostral; Ach, acétylcholine; Glu, glutamate; GABA, acide γ-aminobutyrique; IML, corne intermédialolatérale de la moelle épinière; NA, noradrénaline. Figure adaptée de Kaur et al., 2016 (contenu en libre accès de *World Journal of Nephrology*).

1.2.2.4. Régulation nerveuse de la pression artérielle

La régulation nerveuse immédiate de la PA est l'un des mécanismes déterminants de la fonction cardiovasculaire. Au repos, le système parasympathique l'emporte sur le sympathique. En effet, le baroréflexe artériel exerce constamment une activité vagale cardio-inhibitrice et une inhibition de l'activité sympathique cardio-accélétratrice sur le NTS. Lors d'une élévation de la PA, il y a augmentation de l'activité afférente dans les nerfs de Ludwig-Cyon et de Hering, dûe à une stimulation accrue des barorécepteurs artériels. Au bulbe rachidien, il y a amplification des neurones glutamatergiques (activateurs du centre cardio-inhibiteur) et GABAergiques (inhibiteurs du centre cardio-accélérateur), entraînant une augmentation de l'activité parasympathique au détriment du sympathique. Cela entraîne une diminution du débit cardiaque et une vasodilatation des vaisseaux sanguins, ce qui cause, au final, une réduction de la PA. Inversement, une baisse de la PA entraîne une diminution de l'activité des barorécepteurs et donc une réduction de l'activité parasympathique et une augmentation du sympathique. Il s'ensuit une augmentation de la FC et de la force de contraction du myocarde, ainsi qu'une vasoconstriction au niveau des artérioles, qui augmente le débit cardiaque et la résistance artérielle périphérique, et conséquemment la PA (Guyton et Hall, 2003; Freet et al., 2013).

2. CONSÉQUENCES DE L'EXAGÉRATION DES RÉFLEXES CARDIORESPIRATOIRES INHIBITEURS PAR LA PRÉMATURITÉ ET CERTAINS FACTEURS DE RISQUE

L'immatunité globale du système neural prédispose les nouveau-nés prématurés à présenter des événements cardiorespiratoires (apnées-bradycardies-désaturations du prématuré). Une exagération des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs est souvent observée chez un nourrisson qui présente un RGO pathologique ou une infection bactérienne ou virale dans les premières semaines de vie, surtout s'il s'agit d'un prématuré. Ces réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs peuvent mener à des malaises sévères, voire au SMSN dans certaines conditions particulières telles un tabagisme maternel prénatal (Leiter et Bohm, 2007; Moon et al., 2007; Siljehav et al., 2015; Carlin et Moon, 2017).

2.1. Événements cardiorespiratoires du prématuré

Selon l'Organisation mondiale de la Santé, la prématurité est définie comme une naissance avant 37 semaines de gestation et est classifiée en différents sous-groupes selon l'âge gestationnel [extrêmement prématuré (< 28 semaines), très prématuré (28 -< 32 semaines), modérément prématuré (32 -< 34 semaines) et tardivement prématuré (34 -< 37 semaines complètes)] (Quinn et al., 2016; Vogel et al., 2018). D'ailleurs, selon les données les plus récentes de Statistique Canada (2017), la prématurité est la 2^e cause de décès infantile après les malformations congénitales et les anomalies chromosomiques (Statistics Canada, 2017). À la naissance, pratiquement tous les aspects du contrôle respiratoire et cardiaque sont immatures, en particulier chez les prématurés. La majorité des anomalies respiratoires chez les nouveau-nés sont dues à l'immatunité ou au développement anormal du contrôle respiratoire (Carroll et Agarwal, 2010). Bien que les nouveau-nés à terme présentent une immatunité cardiorespiratoire moindre que les nouveau-nés prématurés, ils sont tout de même sujets à une instabilité cardiorespiratoire. Cette dernière se caractérise par des pauses respiratoires (apnées), des ralentissements de la FC (bradycardies) (Carroll et Agarwal, 2010) et une respiration périodique (définie comme trois épisodes ou plus d'apnée centrale durant au moins 3 secondes, séparés par pas plus de 20 secondes de respiration normale) (Katz,

2012). Par ailleurs, la durée, la fréquence et la gravité des apnées-bradycardies sont directement liés avec le degré d'imaturité (âge gestationnel), prédisposant les extrêmes prématurés à une instabilité cardiorespiratoire accrue (Carroll et Agarwal, 2010; Eichenwald, 2016; Fairchild et al., 2016).

2.1.1. Apnées-bradycardies du prématuré

Bien que les apnées et les bradycardies surviennent souvent ensemble, elles peuvent, néanmoins, survenir l'une et l'autre isolément. Les apnées du prématuré sont l'un des diagnostics les plus courants dans les unités de soins intensifs néonataux due à une immaturité anatomique et physiologique (Abu-Shaweesh et Martin, 2008; Zhao et al., 2011; Eichenwald, 2016; McDonald et al., 2019). Elles sont caractérisées par l'interruption du débit respiratoire durant plus de 20 secondes ou d'une durée plus courte si elles sont accompagnées d'une bradycardie ($FC < 80$ bpm) et/ou d'une hypoxémie ($SpO_2 < 80$ à 85%) (Eichenwald, 2016; Samson et al., 2018). Les apnées peuvent être classifiées en trois catégories selon la présence ou non d'efforts respiratoires. (1) L'apnée centrale, secondaire à l'interruption de la commande respiratoire centrale, est caractérisée par une cessation des efforts respiratoires, (2) l'apnée obstructive, qui correspond à une obstruction du flux d'air au niveau des voies aériennes supérieures, est reconnue par la persistance des mouvements respiratoires et (3) l'apnée mixte commence en général comme une apnée centrale et se termine comme une apnée obstructive (Di Fiore et al., 2013; Eichenwald, 2016). Chez les nouveau-nés prématurés, l'apnée mixte est la plus fréquente (représentant 50% des longs épisodes apnéiques), suivie de l'apnée centrale. Néanmoins, l'apnée obstructive est plutôt rare chez les nourrissons (Di Fiore et al., 2016; Eichenwald, 2016). Le traitement courant des apnées du prématuré repose sur l'administration de caféine qui stimule les centres respiratoires ou l'utilisation d'un support ventilatoire par voie nasale. Ce dernier consiste en l'application d'une pression positive continue dans les voies aériennes (nCPAP «*nasal continuous positive airway pressure*») qui maintient les voies aériennes supérieures ouvertes et augmentent le volume pulmonaire, diminuant ainsi l'instabilité respiratoire (Eichenwald, 2016).

Des ralentissements de la FC (bradycardies) sont également fréquents chez le prématuré en raison de l'immatunité du système de contrôle cardiovasculaire qui rend ce dernier particulièrement sensible à toute perturbation (ex. hypoxie, apnée, RGO) (Hofstetter et al., 2008). Les bradycardies correspondent à une diminution de la FC de plus de 33% pendant plus de 5 secondes (Poets et al., 1993). Une grande proportion des bradycardies sont associées avec une apnée et/ou une désaturation en oxygène. Il y a peu de données sur la pathogenèse des bradycardies dans la littérature (Poets et al., 1993).

Physiopathologie des apnées du prématuré

Bien que la recherche sur le contrôle respiratoire chez les animaux immatures et les nouveau-nés prématurés a permis de faire progresser les connaissances sur la pathogenèse des apnées du prématuré, plusieurs hypothèses demeurent irrésolues dans la littérature. Les apnées du prématuré résultent d'un certain nombre d'influences affectant le patron respiratoire central, les chémorécepteurs périphériques et centraux et les mécanorécepteurs entraînant ainsi une réduction de la commande centrale vers les muscles respiratoires (Di Fiore et al., 2013).

La naissance provoque normalement un enchainement d'adaptations physiologiques. Néanmoins, les changements neuro-développementaux normaux sont interrompus par la prématurité ayant pour répercussion un système cardiorespiratoire immature (Mcdonald et al., 2019). Cette immaturité se manifeste, entre autres, par une altération de la génèse et de la modulation du rythme respiratoire au niveau du tronc cérébral et une diminution de la chémosensibilité centrale (\downarrow réponse ventilatoire au CO_2) (Abu-Shaweesh et Martin, 2008; Carroll et Agarwal, 2010; Zhao et al., 2011; Eichenwald, 2016). De plus, chez les prématurés, des mécanismes de défense au niveau respiratoire tels que la toux et les CRL sont immatures, ainsi que d'autres fonctions physiologiques incluant la réaction d'éveil, la déglutition, la thermorégulation et le sommeil (Thach et Menon, 1985; Reix et al., 2007; Zhao et al., 2011; Darnall, 2013). La précarité respiratoire fait en sorte que tout facteur de stress peut déclencher ou augmenter la fréquence des apnées du prématuré (Carroll et Agarwal, 2010). Parmi ces nombreux facteurs, on retrouve les infections systémiques bactériennes et virales

(Hofstetter et al., 2008; Zhao et al., 2011; McDonald et al., 2019), les RGO, l'hyperthermie (Zhao et al., 2011) et l'hypoxie (McDonald et al., 2019). En effet, des études ont montré une amplification des réflexes d'inhibition cardiorespiratoires lors d'un CRL ou d'un RGO chez des agneaux et nouveau-nés prématurés (St-Hilaire et al., 2007; Eichenwald, 2016; Nault et al., 2017).

2.2. Malaises sévères des nourrissons (BRUE « *brief resolved unexplained event* »)

Bien que la physiopathologie des apnées du prématuré ait fait l'objet de nombreuses études, les apnées chez les nouveau-nés à terme représentent un plus grand défi. Durant les premiers jours de vie, les apnées du nouveau-né peuvent refléter des événements physiologiques (ex. l'alimentation), ou peut être le reflet d'une pathologie. Après la période néonatale (4 semaines après la naissance), bien qu'elle ne soit pas indispensable, l'apnée peut être qualifiée d'événement BRUE (« *brief resolved unexplained event* », qui a remplacé, en 2016, l'acronyme ALTE (« *apparent life-threatening event* ») et, souvent, un événement déclencheur ne peut pas être identifié (Patrinos et Martin, 2017). Bien qu'un nouveau-né soit à terme, son système respiratoire demeure fragile et vulnérable à divers facteurs de stress, surtout durant les six premiers mois de vie (Patrinos et Martin, 2017). Plus précisément, un BRUE est un épisode transitoire caractérisé par un ensemble de modifications imprévues ne conduisant pas à la mort subite. Ces changements se traduisent par la présence d'apnées, d'une modification du teint (cyanose ou pâleur), de l'état de conscience, du rythme respiratoire et/ou du tonus musculaire (hypertonie ou hypotonie) et qui semble mettre en jeu le pronostic vital (Patrinos et Martin, 2017). De plus, les BRUE peuvent être reliés à des RGO (Nunez et al., 2011) et/ou à des CRL (Praud, 2010) qui font office de facteur de stress.

2.3. Syndrome de mort subite du nourrisson

Le syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN) est défini comme le décès soudain et inattendu d'un nourrisson de moins de 1 an sans antécédent pathologique, survenant généralement durant le sommeil, et qui reste inexpliqué suite à une enquête détaillée incluant

une autopsie et l'analyse des circonstances du décès (Horne, 2019). La « Théorie du Triple Risque », développée par Filiano et Kinney en 1994, suggère que, lorsqu'un nourrisson vulnérable (ex. né prématurément ou exposé au tabagisme maternel) se trouve dans une période critique de développement (entre 2 à 4 mois, la plupart des décès ayant lieu avant 6 mois) et est exposé à un facteur de stress exogène aigu (ex. position ventrale de sommeil, RGO, infections et CRL) l'incidence du SMSN augmente (Filiano et Kinney, 1994; Gauda et al., 2007; Praud, 2010; Horne, 2019). Ainsi, selon la théorie, le SMSN est possible uniquement si les trois éléments sont présents simultanément (Figure 5). Des études chez les futures victimes du SMSN ont montré des caractéristiques cardiorespiratoires, circulatoires, et d'éveil modifiées par rapport aux témoins d'âgés appariés. Or, il a largement été suggéré que l'élément final menant au SMSN peut impliquer un contrôle cardiorespiratoire immature combiné à une inefficacité des mécanismes d'éveil et d'autoréanimation (Leiter et Bohm, 2007; Moon et al., 2007; Franco et al., 2010). Cette hypothèse relève du fait que des études physiologiques ont montré que les principaux facteurs de risque du SMSN (ex. prématurité, position ventrale de sommeil, tabagisme maternel) ont des effets importants sur la PA et la FC, ainsi que sur leur contrôle et leur effet sur la réaction d'éveil durant le sommeil (Horne, 2019).

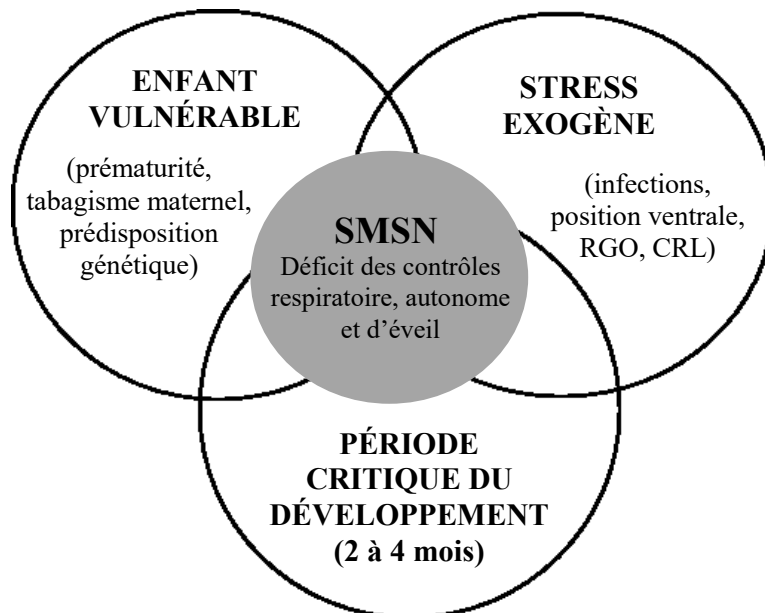


Figure 5. Diagramme de Venn illustrant la théorie du triple risque du SMSN développée en 1994 par Filiano et Kinney. Selon la théorie, le SMSN est probable uniquement si les trois éléments sont présents simultanément, c'est-à-dire un enfant présentant une vulnérabilité sous-jacente (ex. prématurité) ayant un stress exogène aigu (ex. infection, RGO) durant la période critique du développement.

3. SEPSIS NÉONATAL

Le sepsis néonatal constitue un problème de santé publique mondial contribuant de manière substantielle à la morbidité et à la mortalité chez les nouveau-nés, en particulier chez les prématurés atteints d'un sepsis à apparition tardive (Mayr et al., 2014; Shane et al., 2017; Ng et al., 2018). En 2017, le sepsis bactérien était classé au 6^e rang des causes de mortalité infantile au Canada (Statistics Canada, 2017). En raison de sa nature hétérogène, le diagnostic clinique reste difficile et les options de traitement spécifiques face au sepsis manquent toujours (Grondman et al., 2020). La reconnaissance et l'identification précoce peuvent améliorer les résultats chez les nouveau-nés atteints de sepsis. Bien que des apnées-bradycardies récurrentes soient fréquemment observées au cours du sepsis néonatal, des altérations plus subtiles de la variabilité de la FC et de la FR sont souvent les premières et uniques manifestations décelables au début du sepsis (Beuchee et al., 2009). L'importance de mieux comprendre les mécanismes responsables de l'altération du contrôle cardiorespiratoire pourra aider les cliniciens pour une meilleure prise en charge au cours du sepsis néonatal. En effet, le dépistage précoce du sepsis néonatal et un traitement rapide et approprié au moyen d'antibiotiques (en cas de sepsis bactérien) permettront de réduire considérablement la mortalité.

3.1. Définition

Le terme sepsis est défini comme une réponse inflammatoire systémique résultant d'une infection bactérienne, virale ou fongique (Mayr et al., 2014; Hotchkiss et al., 2016; Singer et al., 2016; Grondman et al., 2020). Bien qu'une prévalence notable, généralement faible, de sepsis viraux ait été signalée (< 5%), le diagnostic précoce et le traitement (virus ne répondent pas aux antibiotiques) peut être plus laborieux (Grondman et al., 2020). D'ailleurs, l'agent pathogène viral le plus courant est l'influenza (Grondman et al., 2020).

Chez les nouveau-nés, le sepsis se caractérise soit par un sepsis à apparition précoce (« *early-onset sepsis* », EOS) ou un sepsis à apparition tardive (« *late-onset sepsis* », LOS) en fonction de l'âge d'apparition des signes cliniques (Shane et al., 2017; Ng et al., 2018). Le EOS se définit

par l'apparition de symptômes dans les 72 heures suivant la naissance et est contracté avant ou pendant l'accouchement, fréquemment associé à une transmission verticale mère-enfant du *Streptocoque du groupe B* (Shane et al., 2017). En revanche, le LOS est caractérisé par l'apparition de symptômes à plus de 72 heures de vie et est contracté à partir de l'environnement (infection nosocomiale néonatale). Les bactéries prédominantes à l'origine du LOS sont *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Escherichia coli* (Gram négatif) (Grondman et al., 2020). Le LOS affecte 10 à 25% des nouveau-nés prématurés hospitalisés en unité de soins intensifs néonataux et son incidence est beaucoup plus élevée que celle du sepsis à apparition précoce (Alcock et al., 2017; Shane et al., 2017). Bien que le facteur néonatal le plus important prédisposant au LOS soit la prématurité, toutes les interventions médicales constituent un facteur de risque (ex. cathéters intravasculaires, ventilation mécanique, nutrition intraveineuse) (Alcock et al., 2017; Shane et al., 2017). Les prématurés sont typiquement plus vulnérables au LOS en raison de l'immaturité de leur système immunitaire (manque d'anticorps et d'immunité). En outre, un prématuré ne peut combattre les microorganismes bactériens, viraux ou fongiques de la même manière que les nouveau-nés à terme. Puisque les anticorps maternels (anticorps IgG) sont transportés *via* le placenta durant le troisième trimestre de la grossesse, la naissance prématurée fait en sorte qu'une partie ou l'entièreté du troisième trimestre est incomplète (Shane et al., 2017). Ainsi, les prématurés acquièrent moins d'immunité généralement transmise par la mère avant leur naissance.

3.2. Réponse inflammatoire lors d'un sepsis

En utilisant des modèles animaux néonataux, une réponse inflammatoire systémique peut être induite en tant que modèle de sepsis. Afin de mimer l'inflammation reliée à une infection, des agonistes des récepteurs de type Toll (TLR) ont été utilisés dans mes études doctorales. Les TLRs jouent un rôle essentiel dans l'activation de l'immunité innée en reconnaissant des modèles spécifiques de composants microbiens. Les lipopolysaccharides (LPS) de *E. Coli* sont des agonistes classiques du TLR4, qui lui, est surtout impliqué dans les infections à bactéries à

Gram négatif (Takeda et Akira, 2004; Kawasaki et Kawai, 2014). L'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I:C) est un agoniste du TLR3, qui lui, est impliqué dans les infections à rhinovirus, virus influenza et virus respiratoire syncytial, responsables d'apnées-bradycardies néonatales (Rudd et al., 2005; Schroeder et al., 2013). Pour simplifier, le terme sepsis bactérien sera utilisé pour définir le TLR4 activé par le LPS et le terme sepsis viral pour définir le TLR3 activé par le Poly I:C. Les TLRs sont des récepteurs de reconnaissance importants du système immunitaire inné et ils sont impliqués dans l'étape initiale de défense de l'hôte contre les microorganismes (Takeda et Akira, 2004; Park et Lee, 2013). Ils sont largement exprimés sur les cellules immunitaires et les cellules non immunitaires. Ils reconnaissent un large éventail de motifs moléculaires caractéristiques des microorganismes (les PAMPs, « *Pathogen Associated Molecular Patterns* »), démontrant ainsi que le système immunitaire des mammifères détecte l'invasion d'agents pathogènes *via* la reconnaissance des composants microbiens par les TLRs (Takeda et Akira, 2004; Kawasaki et Kawai, 2014; Takeda et Akira, 2015). Tous les TLRs sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique, acheminés vers le Golgi et recrutés à la surface des cellules (pour ceux spécialisés dans la reconnaissance de composés microbiens) ou dans des compartiments intracellulaires tels que les endosomes (pour ceux spécialisés dans la reconnaissance des acides nucléiques) (Yang et Seki, 2012; Kawasaki et Kawai, 2014). Le TLR4 est donc exprimé à la surface des cellules alors que le TLR3 est localisé dans les endosomes. Le TLR4 reconnaît le LPS, un composant majeur de la membrane externe de la plupart des bactéries à Gram négatif et un puissant immunostimulateur (Park et Lee, 2013). Le TLR3, quant à lui, reconnaît principalement les virus à ARN double brin (ARNdb), ainsi que l'homologue structural synthétique, le Poly I:C (Takeda et Akira, 2004; Yang et Seki, 2012; Kawasaki et Kawai, 2014; Takeda et Akira, 2015). L'ARNdb est produit par la plupart des virus pendant leur réplication et il est connu pour induire la synthèse d'interférons de type I (Takeda et Akira, 2015). Puisque la structure du Poly I:C (ARNdb) est semblable à l'ARN de certains virus, il peut interagir avec le TLR3 pour mimer un sepsis viral en provoquant une réponse immunitaire. Les connaissances acquises au fil du temps révèlent que les voies de signalisation des TLRs consistent en une voie dépendante de MyD88 commune à tous les TLRs, et une voie indépendante de MyD88 (dépendante de TRIF) qui est

propre à la signalisation des TLR3 et TLR4 (Kawasaki et Kawai, 2014) (Figure 6). La signalisation de la voie dépendante de MyD88 permet au facteur de transcription NF- κ B de transloquer vers le noyau afin d'induire l'expression de gènes pro-inflammatoires. La voie MyD88 est donc essentielle pour l'induction de cytokines pro-inflammatoires. La cascade de signalisation de la voie indépendante de MyD88 (TRIF) mène, quant à elle, à l'activation et la translocation du facteur de transcription IRF3 vers le noyau, où il induit l'expression des interférons (INF) de type I (Kawasaki et Kawai, 2014). Une production équilibrée des cytokines pro-inflammatoires et des IFN de type I peut être importante afin de contrôler la croissance des cellules tumorales et les maladies auto-immunes (Kawasaki et Kawai, 2014).

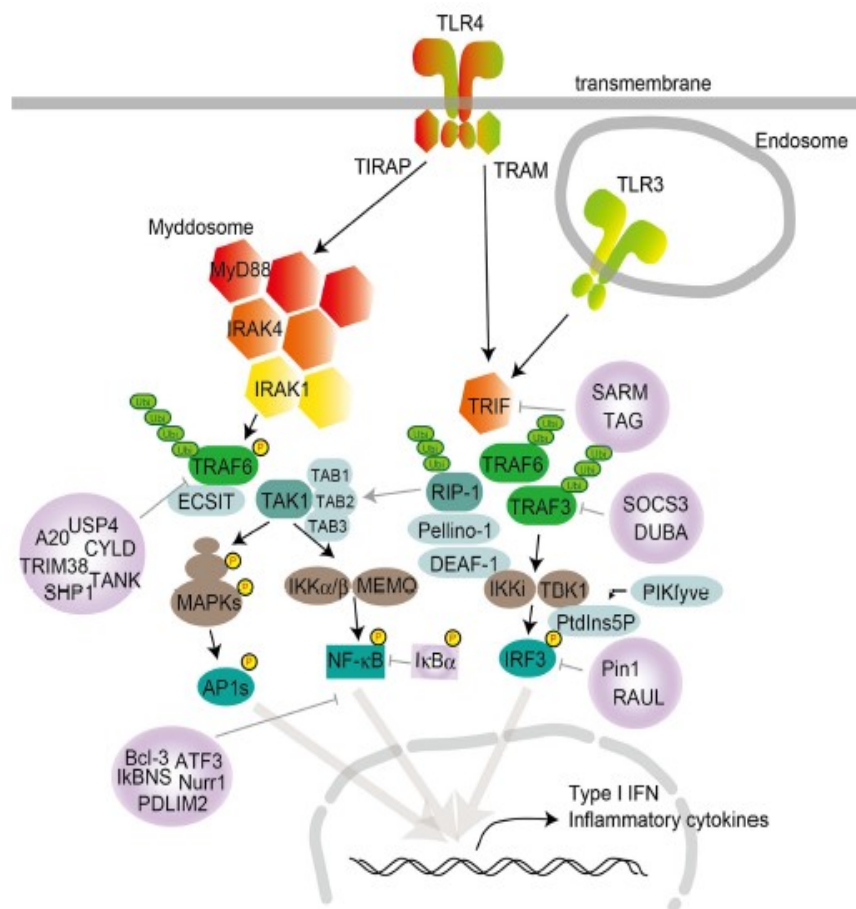


Figure 6. Signalisation des TLR4 et des TLR3. L'activation des TLR4 et 3 induit la signalisation vers les deux principales protéines adaptatrices, MyD88 (indirecte pour le TLR3) et TRIF (voie indépendante de MyD88). La cascade de signalisation des voies dépendante et indépendante de MyD88 mènent à l'induction de cytokines pro-inflammatoires (via l'activation de NF- κ B) et l'expression des interférons de type I (via l'activation de IRF3) dans le noyau du cytoplasme. Figure de Kawasaki et Kawai, 2014 (contenu en libre accès de *Frontiers in Immunology*).

3.3. Sepsis, médiateurs inflammatoires, apnées et SMSN

Dans cette section, on s'intéresse plus particulièrement à la relation entre une infection chez le nourrisson et le SMSN. Les événements cardiorespiratoires constituent un problème courant chez les nourrissons ayant un sepsis, avec une incidence accrue chez les prématurés (Bruhn et al., 1977; Fanaroff et al., 1998; Raza et Blackwell, 1999; Hofstetter et al., 2007; Balan et al., 2011; Siljehav et al., 2012; Siljehav et al., 2015). En effet, un nombre important de nouveau-nés hospitalisés atteints du virus respiratoire syncytial et du LOS souffrent d'apnées potentiellement mortelles (Fanaroff et al., 1998; Hofstetter et al., 2008; Siljehav et al., 2012). Les apnées (ou parfois les bradycardies) associées à une infection et à une inflammation sont une préoccupation médicale majeure durant les premières semaines de vie puisque les données actuelles suspectent une cause infectieuse et hypoxique impliquant des cytokines pro-inflammatoires dans la pathogenèse du SMSN (Siljehav et al., 2012). Davantage de décès dus au SMSN se produisent durant les mois d'hiver lorsque les infections virales sont plus fréquentes (surtout celles des voies aériennes supérieures) et entre 2-4 mois de vie où l'immaturité immunologique est à son comble (Raza et Blackwell, 1999; Leiter et Bohm, 2007; Blood-Siegfried, 2009). En effet, plusieurs évidences portent à croire qu'il existe un lien de causalité entre les infections et le SMSN. Une étude a révélé que les nourrissons victimes du SMSN logent une variété d'espèces bactériennes dans leurs voies aériennes supérieures, dont les plus communément isolées sont *Staphylococcus aureus* et *E. coli*; cependant, aucun organisme ne peut être identifié comme causant la mort (Blood-Siegfried, 2009). En effet, une équipe de chercheurs a examiné 57 décès soudains chez des nourrissons et des enfants parmi lesquels 40 étaient des cas de SMSN. Au niveau du péricarde, ils ont observé des bactéries à Gram négatif, en particulier *E. coli*, dans 79% (45/57) des cas de décès soudains dont 85% (34/40) des cas de SMSN lors d'une autopsie (Rambaud et al., 1999). Les bactéries à Gram négatif contiennent des endotoxines (lipopolysaccharides) dans leur paroi cellulaire qui sont de puissants stimulants des cytokines pro-inflammatoires, dont IL-1, IL-6, TNF- α , et IFN- γ (Blood-Siegfried, 2009). Des bactéries à Gram positif au niveau des voies aériennes supérieures, dont *S. aureus*, ont aussi été retrouvées chez 68% (15/22) des victimes du SMSN en comparaison avec 36% (8/22) chez les contrôles d'âges appariés (McKendrick et al., 1992).

3.3.1. Conséquences d'un stress postnatal (sepsis) sur les CRL

Les infections chez le nourrisson peuvent également favoriser la survenue du SMSN *via* l'exagération de réflexes inhibiteurs. De nombreuses études ont révélé une exagération des chémoréflexes laryngés lors d'une inflammation systémique ou des voies aériennes supérieures chez différentes espèces mammifères étudiées. L'importance d'étudier ces CRL chez les organismes immatures vient de leur implication dans les événements cardiorespiratoires paroxystiques (apnées-bradycardies du prématuré, malaises sévères et SMSN), tout comme les RGO.

Études expérimentales chez des modèles animaux nouveau-nés

Des résultats ont montré que l'injection IV d'IL-1 β a augmenté le nombre (Stoltenberg et al., 1994) et la durée des apnées induites par les chémoréflexes laryngés chez les porcelets (Froen et al., 2000). De plus, l'inhibition respiratoire des CRL a été amplifiée chez les agneaux avec une laryngite de reflux induite (Carreau et al., 2011). Les infections par le virus respiratoire syncytial ont également été associées à une augmentation de l'apnée et une inhibition de l'éveil chez les agneaux (Lindgren et al., 1992). Or, un défaut de la réaction d'éveil et une incapacité à interrompre l'apnée réflexe peuvent jouer un rôle dans la pathogénie du SMSN (Leiter et Bohm, 2007).

Études expérimentales chez des nouveau-nés humains

Une étude a montré que l'infection par le virus respiratoire syncytial a augmenté l'inhibition respiratoire liée aux CRL chez des nourrissons humains (âgés de moins de 6 mois) (Lindgren et al., 1996). Ces observations peuvent avoir une pertinence pour la pathogenèse du SMSN et pour les apnées centrales reliées à une infection virale respiratoire chez les jeunes nourrissons (Thach, 1997; Ralston et Hill, 2009).

3.3.2. Sepsis néonatal et médiateurs inflammatoires

Deux études d'une équipe de recherche suédoise ont proposé un modèle illustrant l'association entre les infections et les apnées. Des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β et la prostaglandine E₂ (PGE₂) ont été proposés pour agir en tant que médiateurs majeurs de l'infection, de l'apnée et du SMSN (en agissant au niveau des centres respiratoires du tronc cérébral) (Hofstetter et al., 2007; Herlenius, 2011). Cette capacité des médiateurs inflammatoires à altérer la réponse ventilatoire a été impliquée dans la pathogenèse du SMSN. Le mécanisme est présenté à la figure 7. Brièvement, au cours d'une réponse immunitaire systémique, la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β est libérée dans le flux sanguin périphérique. Une fois liée à son récepteur (IL-1R) situé sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, l'activation de l'IL-1R induit la synthèse de PGE₂. La PGE₂ diffuse au niveau du parenchyme cérébral afin de se lier à son récepteur EP3R situé au niveau des centres respiratoires du tronc cérébral (NTS et substance réticulée bulbaire ventrolatérale), ce qui peut provoquer une dépression respiratoire, des apnées et une altération du mécanisme d'autoréanimation lors d'un événement hypoxique (Hofstetter et al., 2007; Herlenius, 2011).

Dans le même ordre d'idées, il est connu que la réaction inflammatoire aux lipopolysaccharides (LPS) inhibe les centres respiratoires du tronc cérébral via la PGE₂ (Hofstetter et al., 2007; Herlenius, 2011). La voie de la PGE₂ semble aussi impliquée dans les apnées reliées à une infection bactérienne chez le prématuré humain (Siljehav et al., 2015), mais elle n'est pas seule en cause et n'explique pas les bradycardies. Par ailleurs, aucune donnée ne semble exister sur l'implication de la PGE₂ dans les apnées reliées à une infection néonatale virale. Bien que des bradycardies semblent être impliquées en cas de sepsis néonatal, aucune preuve de cette relation n'existe actuellement dans la littérature (Siljehav et al., 2015).

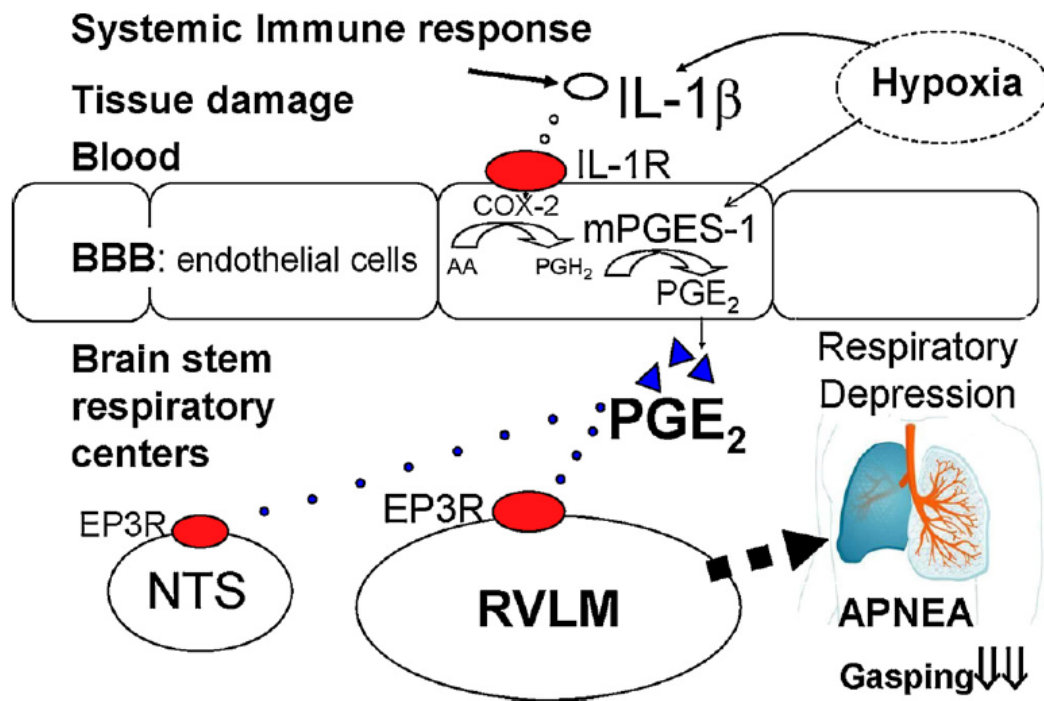


Figure 7. Mécanisme proposé de la voie de la PGE₂. Cette voie implique une réponse inflammatoire systémique qui, via une cascade de réactions, entraîne des apnées et une dépression respiratoire. IL-1 β , interleukine-1 β ; IL-1R, récepteur IL-1; BBB, barrière hémato-encéphalique; COX-2, cyclooxygénase 2; AA, acide arachidonique; PGH₂, prostaglandine H₂; mPGES-1, prostaglandine E₂ synthase microsomale; PGE₂, prostaglandine E₂; EP3R, récepteur EP3; NTS, noyau du tractus solitaire; RVLM, substance réticulée bulbaire ventrolatérale. Figure de Herlenius, 2007 avec autorisation de reproduction de *Respiratory Physiology & Neurobiology*.

4. PHYSIOLOGIE ŒSOPHAGIENNE

L'œsophage humain adulte est un conduit musculaire d'environ 18 à 26 cm de longueur qui achemine le bol alimentaire jusqu'à l'estomac. Il est fermé à son extrémité supérieure par le sphincter supérieur de l'œsophage (SSO) et à son extrémité inférieure par le sphincter inférieur de l'œsophage (SIO). La paroi œsophagienne possède une épaisseur d'environ 3 mm alors que sa lumière peut se distendre de 2 à 3 cm de diamètre (Kuo et Urma, 2006). La musculature de l'œsophage est constituée de plusieurs couches : 1) la muqueuse est la couche interne de l'œsophage, elle est en contact avec la lumière du corps œsophagien et elle est constituée d'un épithélium stratifié, 2) la sous-muqueuse est une couche de tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins, en nerfs et en glandes, 3) la musculeuse est constituée de deux couches musculaires : une couche interne, composée de fibres musculaires circulaires et une couche externe composée de fibres musculaires longitudinales. Les deux couches sont séparées par le plexus myentérique d'Auerbach, 4) l'adventice est la couche conjonctive externe constituée de fibres de collagène et de cellules adipeuses (Kuo et Urma, 2006). Le transport du bol alimentaire se fait *via* le péristaltisme. Il existe deux types de péristaltisme, soit le péristaltisme primaire (activé par les déglutitions) et le péristaltisme secondaire (activé par une distension du corps œsophagien).

4.1. Innervation

L'innervation de l'œsophage est doublement assurée par le nerf vague (parasymphatique) et le nerf spinal (sympathique) (Sengupta, 2000). Les fibres afférentes vagales projettent au NTS, alors que les fibres efférentes vagales prennent origine au noyau moteur dorsal du nerf vague. Les afférences vagales et spinales ont leur corps cellulaire localisé soit dans les ganglions jugulaire et plexiforme (afférences parasymphatiques), soit dans les ganglions de la chaîne sympathique cervicale et thoracique (afférences sympathiques) respectivement. La partie supérieure cervicale de l'œsophage est principalement innervée *via* les nerfs laryngés récurrents. La partie thoracique supérieure de l'œsophage est innervée par le nerf laryngé supérieur et le nerf vague, alors que la partie thoracique inférieure, la partie abdominale, et

le sphincter inférieur de l'œsophage sont tous innervés par les afférences vagales (Sengupta, 2000).

Lors d'une distension œsophagienne, les afférences vagales (qui innervent le SSO, le corps œsophagien et le SIO) sont acheminées jusqu'au NTS (situé dans le tronc cérébral) en passant par le ganglion plexiforme; le NTS constitue le premier relais synaptique. Les signaux sont ensuite transmis au noyau moteur dorsal du nerf vague (pour le traitement des données) où les efférences vagales prennent origine (Mittal et al., 1995). Puis, les influx réflexes retournent *via* les fibres motrices du nerf vague vers l'œsophage; de plus, les fibres efférentes projettent vers le nœud sinusal du cœur permettant de moduler la fréquence cardiaque (FC) afin de potentiellement mener à une bradycardie ou un ralentissement cardiaque (réflexe d'inhibition cardiorespiratoire). De plus, des neurones prémoteurs, dont le corps cellulaire est dans le noyau ambigu, font synapse avec des motoneurones dans le noyau du nerf phrénique situé au niveau de la moelle cervicale. À partir de ce dernier, le nerf phrénique projette au niveau du diaphragme afin d'inhiber les piliers du diaphragme (diaphragme crural) et potentiellement mener à une apnée (Mittal et al., 1995). L'innervation œsophagienne est schématisée à la figure 8.

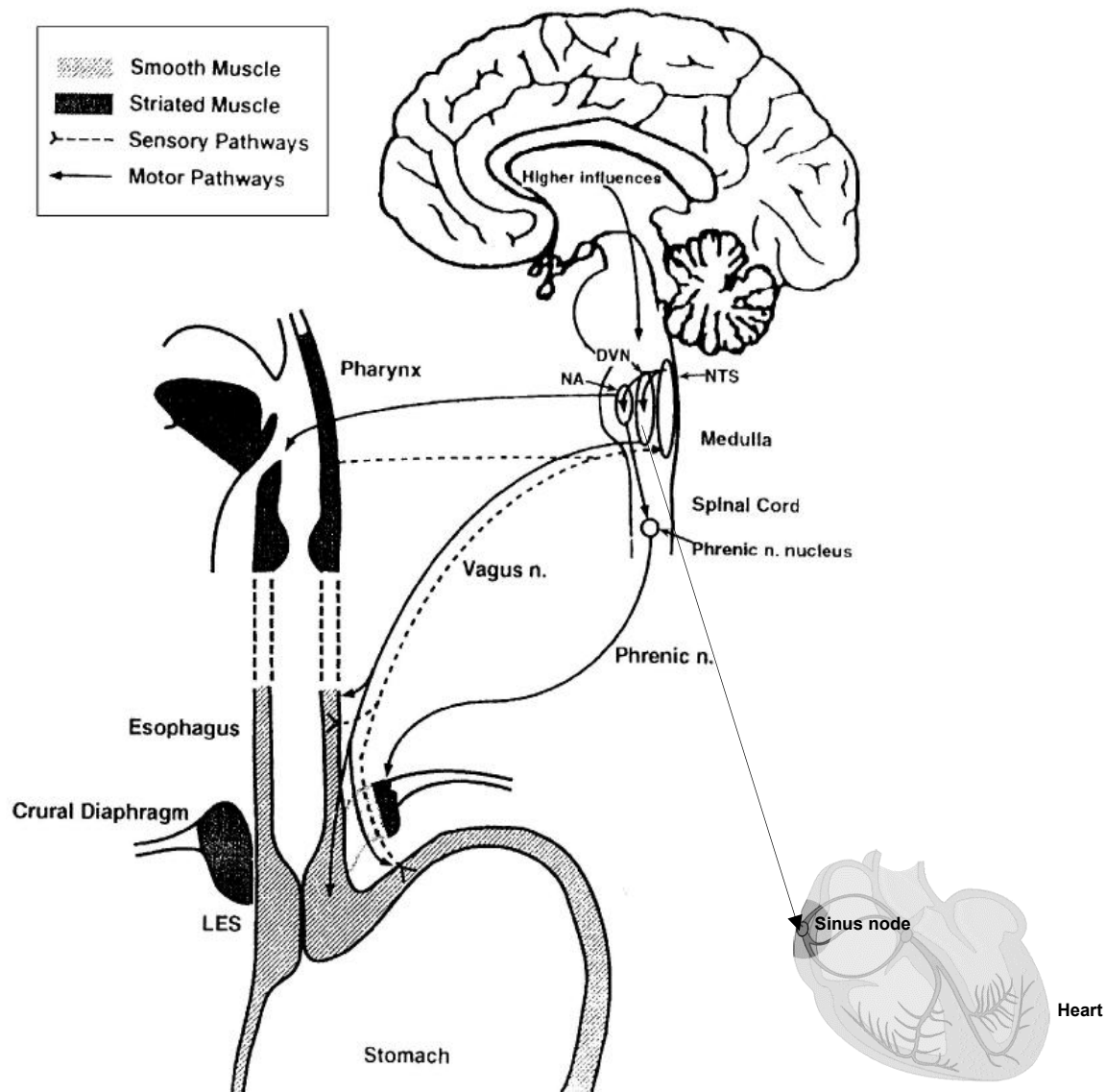


Figure 8. Innervation de l'œsophage. Les afférences et efférences vagales innervent le SSO, le corps œsophagien et le sphincter inférieur de l'œsophage. Le premier relais synaptique des afférences vagales se situe au NTS alors que les efférences vagales prennent origine au noyau moteur dorsal du nerf vague. Le nerf phrénique contrôle le diaphragme crural à partir du noyau du nerf phrénique situé au niveau de la moelle cervicale. NA, noyau ambigu; DVN, noyau moteur dorsal du vague; NTS, noyau du faisceau solitaire; LES, lower esophageal sphincter. Figure adaptée de Mittal et al., 1995 avec autorisation de reproduction de *Gastroenterology*.

4.2. Sphincters œsophagiens

La fonction principale de l'œsophage est d'acheminer le bol alimentaire dégluti vers l'estomac à l'aide du péristaltisme du corps œsophagien et du relâchement synchronisé du sphincter supérieur et inférieur de l'œsophage. Le corps de l'œsophage, qui au repos ne possède pas d'activité motrice, transporte le bol alimentaire ingéré du pharynx jusqu'à l'estomac; c'est le phénomène du péristaltisme primaire, initié par les déglutitions. Le péristaltisme secondaire, quant à lui, se manifeste en l'absence de déglutition et est provoqué par toute distension œsophagienne (présence de liquide ou solide restant dans l'œsophage après une déglutition ou après un reflux gastro-œsophagien). Le SSO permet l'entrée de la nourriture au niveau de l'œsophage alors que le SIO facilite l'entrée du bol alimentaire dans l'estomac (Shaffer et al., 2005). En plus d'acheminer la nourriture à l'estomac, l'œsophage possède des fonctions de protection, empêchant ainsi le flux rétrograde du contenu gastrique. Plus précisément, le SSO protège les voies aériennes supérieures de tout contenu solide ou liquide présent dans l'œsophage suite à une déglutition ou un reflux gastrique tandis que le SIO protège le corps de l'œsophage contre un reflux gastrique (Sullivan et Sundaram, 2012).

Sphincter supérieur de l'œsophage (SSO)

Le SSO est situé entre le pharynx et l'œsophage cervical, il borne la partie supérieure de l'œsophage. Il est principalement constitué de fibres du muscle cricopharyngé et caudales des muscles constricteurs pharyngés inférieurs. Il s'agit plus d'une définition physiologique que d'une réalité anatomique; c'est en fait le muscle strié cricopharyngé qui détermine une zone de haute pression sur une longueur de 2 à 4 cm, c'est pourquoi on dit que c'est une valve physiologique (Shaffer et al., 2005). Le SSO agit en tant que barrière de pression (barrière anti-reflux). Il protège les voies respiratoires du flux rétrograde lors d'un RGO proximal et de l'entrée d'air dans l'œsophage durant l'inspiration. La fonction du SSO est contrôlée par une variété de réflexes qui provoquent soit une contraction, soit une relaxation de son activité tonique (Kuo et Urma, 2006).

Sphincter inférieur de l'œsophage (SIO)

Tout comme dans le cas du SSO, il s'agit plus d'une définition physiologique que d'une réalité anatomique, c'est-à-dire qu'aucune structure macroscopique ne distingue le SIO du reste de l'œsophage. En plus de contrôler le passage du bol alimentaire vers l'estomac à la jonction œsophago-gastrique, il constitue une barrière anti-reflux importante (Shaffer et al., 2005). Au repos, le SIO, dans sa configuration fermée, empêche le contenu gastrique de refluer vers la lumière œsophagienne en maintenant une pression supérieure à celle de l'estomac et s'entrouvre telle une valve suite à une déglutition (péristaltisme primaire) laissant passer le bol alimentaire dans l'estomac (Sullivan et Sundaram, 2012). Cette valve, composée d'un épaissement de muscles lisses circulaires, constitue une zone de haute pression où la fine coordination ouverture/fermeture de son activité tonique est nécessaire à la prévention d'un reflux du contenu gastrique entre les déglutitions. Or, le SIO exécute une protection efficace grâce à son tonus de base, ou autrement la pression au repos du SIO qui est toujours supérieure à la pression à l'intérieur de l'estomac prévient la remontée du liquide gastrique (Sullivan et Sundaram, 2012).

Bien que l'activité tonique du SIO empêche le contenu gastrique de refluer, les RGO sont un phénomène courant et normal chez les individus en bonne santé et surviennent principalement durant les épisodes de relaxation transitoire du SIO (Slocum et al., 2007). Le principal mécanisme des épisodes de reflux chez les nourrissons et chez l'adulte est la relaxation transitoire du SIO. Une relaxation transitoire du SIO se caractérise par un brusque relâchement du SIO qui inhibe la barrière de pression gastro-œsophagienne et permet ainsi au contenu gastrique de remonter vers l'œsophage en l'absence de déglutition (sans opposition par le péristaltisme œsophagien) (Shaffer et al., 2005; Slocum et al., 2007; Hershcovici et al., 2011). Ces relaxations transitoires surviennent indépendamment d'une déglutition ou du péristaltisme secondaire. De plus, elles s'accompagnent d'une diminution de l'activité tonique du diaphragme crural. Il y a donc une inhibition simultanée, synchronisée du SIO et du pilier diaphragmatique.

En fait, les relaxations transitoires du SIO sont caractérisées par des relaxations non coordonnées avec le processus de déglutition, et représentent le principal mécanisme responsable des RGO chez la population pédiatrique (Hershcovici et al., 2011). Cet événement physiologique peut, cependant, devenir pathologique si les RGO entraînent des complications secondaires. Puisque les nouveau-nés possèdent un SIO hypotonique, c'est-à-dire un SIO immature accompagné d'une réduction du tonus de base, ils sont plus susceptibles à des relaxations transitoires du SIO qui laissent refluer le contenu gastrique (Shaffer et al., 2005).

4.3. Récepteurs œsophagiens

Selon la littérature, il existe une relation entre les réflexes provenant des récepteurs œsophagiens et les événements cardiorespiratoires tels que les apnées, les bradycardies et les désaturations en oxygène survenant chez les nouveau-nés (Paterson, 2001; Mousa et al., 2005; Qureshi et al., 2015). La stimulation de ces récepteurs œsophagiens est possible, entre autres, lors de deux situations fréquemment rencontrées en clinique : 1) lors d'un reflux gastro-œsophagien ou 2) lors de l'insufflation fortuite d'air dans l'œsophage en ventilation nasale. Bien que deux sous-familles de récepteurs œsophagiens ont été décrites jusqu'à ce jour, les récepteurs ASIC («*Acid-Sensing Ion Channel*») et les TRP («*Transient Receptor Potential Cation Channel*»), très peu d'informations existent dans la littérature concernant les récepteurs œsophagiens, ce qui représente un défi.

4.3.1. Canaux ASIC

Les récepteurs ASIC sont des canaux cationiques excitateurs activés par les protons extracellulaires (Cheng et al., 2018). Ils possèdent quatre gènes codant pour six sous-unités (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 et ASIC4) parmi lesquels ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b et ASIC3 s'avèrent présents au niveau des afférences qui innervent l'œsophage (Dusenкова et al., 2014). Chaque sous-type ASIC contient deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2) reliés par une boucle extracellulaire avec des extrémités intracellulaires N- et C-terminale. Le domaine de la région N-terminale, voisine de TM1, est impliqué dans la sélectivité du canal au sodium. Le pore conducteur à travers la membrane est formé par des

contacts entre les domaines TM1 et TM2 des trois sous-unités (Osmakov et al., 2014; Cheng et al., 2018), lesquelles sont nécessaires pour former un canal fonctionnel. Un canal fonctionnel peut être composé de trois sous-types ASIC identiques (homomères) ou une combinaison de différents sous-types ASIC (hétéromères) (Dusenкова et al., 2014; Osmakov et al., 2014; Cheng et al., 2018). Les canaux ASIC sont souvent exprimés dans les nerfs afférents primaires et sont impliqués dans la chémosensibilité (transduction de l'acide) et la mécanosensibilité gastro-intestinale (mécanotransduction). Les canaux ASIC jouent donc un rôle dans la mécano- et la chémo-nociception. En particulier, la détection de l'acidose tissulaire par les ASIC lors d'une tumeur, une lésion tissulaire, une inflammation, une ischémie et un accident vasculaire cérébral entraîne l'activation des nerfs sensibles à la douleur en périphérie et la transmission subséquente des signaux de douleur au cerveau (Julius et Basbaum, 2011 ; Cheng et al., 2018). De ce fait, des études ont montré l'expression de nombreuses sous-unités ASIC dans les fibres nociceptives A δ et C (Dusenкова et al., 2014).

Tel que mentionné précédemment, la grande majorité des canaux ASIC sont activés par des protons extracellulaires. Lors d'une acidose, les protons compétitionneraient avec le calcium (inhibiteurs des canaux ASIC) pour le même site de liaison entraînant la libération du pore *via* un changement de conformation. La levée des ions calciques est essentielle afin de permettre la liaison des protons sur le canal et son activation ultérieure. Cette sensibilité à l'acidité est dépendante de la composition des sous-unités ASIC. En effet, le canal hétéromère ASIC1a/ASIC2b est davantage sensible à l'acide que le canal homomère ASIC1a ou ASIC2b. Les propriétés de mécanotransduction des ASIC dépendent aussi de la composition des sous-unités (Dusenкова et al., 2014). Or, la connaissance du profil d'expression des sous-unités des canaux ASIC dans un type particulier de nerf est nécessaire afin de bien comprendre le rôle des ASIC dans ce type de nerf (Cheng et al., 2018).

Il est à noter que les mécanismes de transduction de l'acide et de la mécanotransduction dans les nerfs sensoriels œsophagiens restent très mal compris à ce jour. De plus, le profil d'expression des canaux ASIC au niveau des afférences nerveuses de l'œsophage demeure largement inconnu (Dusenкова et al., 2014).

4.3.2. Canaux TRP

Les canaux TRP des mammifères sont des protéines membranaires non sélectives perméables aux cations qui sont regroupées en six sous-familles (TRPN étant absent chez les mammifères) sur la base des homologies structurelles des acides aminés: TRPA (Ankyrine), TRPC (Canonique), TRPM (Mélastatine), TRPML (Mucolipine), TRPP (Polycystine) et TRPV (Vanilloïde). Ces canaux sont formés de six hélices transmembranaires avec des domaines intracellulaires N- et C- terminal dont le pore est localisé entre la cinquième et la sixième hélice. Les TRP s'assemblent en homo- ou hétéro-tétramères de manière à former un canal cationique non sélectif (Vassort et Fauconnier, 2008; Samanta et al., 2018). Ce sont également des canaux polymodaux à proprement parler, puisqu'ils sont activés de façon très variée par des messagers intra- ou extracellulaires (ex. phosphorylation via protéine kinase), des composés chimiques ou des stimulations mécaniques (Samanta et al., 2018).

Au niveau de l'œsophage, deux membres des sous-familles TRPA (TRPA1) et TRPV (TRPV1) ont été décrits (Rosenbaum et Simon, 2007). Le récepteur homo-tétramérique TRPA1 est le seul représentant de la famille des TRPA et diffère des autres canaux TRP par son nombre élevé de répétitions du motif ankyrine (Vassort et Fauconnier, 2008). TRPA1 est activé, entre autres, par une stimulation nociceptive froide et les substances piquantes telles que l'ail et l'oignon (insensible au menthol et à la capsaïcine) (Dhaka et al., 2006; Rosenbaum et Simon, 2007; Samanta et al., 2018). Néanmoins, il est maintenant mieux décrit comme nocicepteur chimique, ce qui en fait une cible idéale pour les analgésiques. De plus, TRPA1 joue un rôle dans la mécanosensibilité œsophagienne et il est exprimé dans les fibres A δ et C et dans certaines fibres A β myélinisées (Samanta et al., 2018). À ce jour, le récepteur homo-tétramérique TRPV1 est le membre des TRP le plus étudié. TRPV1 est, entre autres, activé par la capsaïcine (ingrédient actif du piment fort), le pH acide et la température extrême (> 42 °C), ce qui le rend important pour la nociception thermique et chimique. En effet, il agit comme chimiosenseurs pour plusieurs ligands endogènes ou synthétiques et il est également exprimé dans les fibres A δ et C (Samanta et al., 2018).

4.4. Types de récepteurs œsophagiens selon le stimulus en cause

Classiquement, trois types de récepteurs œsophagiens ont été décrits et peuvent être activés selon le type de stimulus. Ces récepteurs incluent les mécanorécepteurs, les chémorécepteurs et les thermorécepteurs. Fait intéressant, ces récepteurs rappellent étrangement les récepteurs bronchopulmonaires décrits précédemment du fait qu'ils découlent du même segment embryonnaire (bourgeon pulmonaire) (Mansfield, 2001). Les afférences sensorielles des différents récepteurs projettent au niveau du système nerveux central vers le tronc cérébral (*via* le nerf vague et le ganglion plexiforme) ou vers la moelle épinière (*via* les nerfs splanchniques). Dans cette thèse, seuls les mécanorécepteurs et les chémorécepteurs seront abordés puisque ce sont eux qui sont mis en jeu lors d'une distension œsophagienne ou d'un reflux gastrique. Toutefois, les thermorécepteurs œsophagiens sont importants dans la motilité œsophagienne du nouveau-né qui est immature durant les premières semaines de vie. Il a été montré, chez l'agneau à terme, que la vitesse de propagation du bolus dans l'œsophage est améliorée lorsque le lait ingéré est à une température proche de la température corporelle (Djeddi et al., 2013).

4.4.1. Les mécanorécepteurs

Les mécanorécepteurs sont surtout mis en jeu lors de stimuli mécaniques, tels que la distension œsophagienne qui peut, notamment, survenir au moment où le bol alimentaire atteint l'œsophage après la déglutition. Plus précisément, les mécanorécepteurs détectent des changements au niveau de la tension exercée sur l'œsophage, ce qui fait d'eux des tenseorécepteurs capables de réguler les réflexes moteurs œsophagiens (Lang et al., 2001). Les mécanorécepteurs se caractérisent en trois types distincts : les récepteurs à adaptation rapide, les récepteurs à adaptation lente et les terminaisons nerveuses des fibres C. Certains types de canaux TRP et ASIC présent dans l'œsophage semblent être classifiés comme mécanorécepteurs. En outre, TRPA1 et ASIC3 possèdent respectivement des rôles prédominants et plus restreints dans la mécanosensibilité œsophagienne (Bielefeldt et Davis, 2008). Il est à noter que la littérature à ce sujet est particulièrement limitée.

Les récepteurs à adaptation rapide ont leurs terminaisons libres au niveau de la muqueuse œsophagienne. De par leur forme particulière, ces terminaisons nerveuses ont été définies en tant que IGLEs (« *intraganglionic laminar endings* ») (Sengupta, 2000). Les récepteurs à adaptation rapide sont des récepteurs sensibles aux stimuli mécaniques et aux irritants chimiques. Bien qu'ils soient activés par des distensions fortes et rapides de l'œsophage, ils sont également sensibles aux composés chimiques, c'est pourquoi on dit qu'ils sont polymodaux (capables de répondre à des stimuli variés). **Les récepteurs à adaptation lente** ont leurs terminaisons libres au niveau de la musculature œsophagienne et ces terminaisons sont appelées IMAs (« *intramuscular array ending* ») (Sengupta, 2000). Les récepteurs à adaptation lente sont surtout des récepteurs à l'étirement. Plus précisément, ils répondent à des distensions lentes de l'œsophage et sont chimiquement insensibles. **Les terminaisons nerveuses des fibres C** se retrouvent au niveau de la muqueuse œsophagienne et ont beaucoup de similarités avec les récepteurs à adaptation rapide, ce sont également des récepteurs polymodaux. Elles sont stimulées par des distensions rapides et sont aussi chimiquement sensibles (ex. capsaïcine). Or, leur sensibilité à la capsaïcine est due à l'activation des TRPV1 présents sur celles-ci (Lang et al., 2001; Rosenbaum et Simon, 2007).

4.4.2. Les chémorécepteurs

La muqueuse œsophagienne possède plusieurs fonctions qui la protègent contre l'agression de l'acidité gastrique. Certaines fibres afférentes vagales œsophagiennes sont spécifiquement sensibles aux stimuli chimiques, par l'intermédiaire de chémorécepteurs situés dans la muqueuse œsophagienne. Ils sont caractérisés comme étant acido-sensibles et chémosensibles au CO₂ (Dhaka et al., 2006). Bien que très peu caractérisés dans la littérature, il semble que les canaux TRPV1 et TRPA1 agissent à titre de chémorécepteurs au niveau de l'œsophage. En effet, ces canaux détectent des écarts importants acides et basiques du pH homéostatique, TRPV1 étant plus sensible aux solutions basiques internes alors que TRPA1 est plus sensible à l'acidité.

Il faut noter qu'une importante acidité intraluminale peut endommager les structures de la muqueuse œsophagienne. C'est pourquoi cette dernière peut détecter cette acidité telle que celle reliée au CO₂, en raison de sa grande diffusibilité à travers l'épithélium, et grâce à l'activité de l'anhydrase carbonique, des récepteurs à l'acide TRPV1 et certains types de récepteurs ASIC (demeurent inconnus). L'anhydrase carbonique catalyse réversiblement la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone en anion bicarbonate et proton, selon la réaction $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ (Akiba et Kaunitz, 2011). Cette détection de l'acidité intraluminale et du CO₂ permet d'activer les mécanismes de défense de la muqueuse afin de maintenir l'intégrité de celle-ci.

5. LES REFLUX GASTRO-OESOPHAGIENS

5.1. Mise en contexte

Un reflux gastro-œsophagien (RGO) se définit comme le passage du contenu gastrique vers l'œsophage (Lightdale et Gremse, 2013). Le reflux qui atteint l'œsophage peut être très acide ($\text{pH} < 4$), modérément acide (pH entre 4 et 7) ou non acide ($\text{pH} > 7$) et peut être de nature liquide, gazeuse ou mixte. Les RGO sont d'une importance capitale en pédiatrie puisqu'ils constituent l'affection œsophagienne la plus courante durant la première année de vie. En effet, les RGO surviennent fréquemment chez les nouveau-nés et particulièrement chez ceux nés prématurément. Un RGO survient surtout lors des 4 premiers mois de vie et se résout avec la maturation (Lightdale et Gremse, 2013; Leung et Hon, 2019). La remontée du contenu gastrique vers l'œsophage, et spécialement celui de l'acide, est le facteur principal de production de symptômes (ex. régurgitations acides) et de lésions (ex. œsophagite de reflux). Plusieurs facteurs physiologiques augmentent la susceptibilité des nouveau-nés aux RGO. Entre autres, la position couchée à la suite du repas entraîne une immersion continue de la jonction gastro-œsophagienne dans le contenu gastrique (Slocum et al., 2007; Eichenwald, 2018). De plus, une grande quantité de lait ingérée, l'ingestion éventuelle d'air durant l'allaitement et l'immaturité du SIO (SIO hypotonique) favorisent les RGO (Slocum et al., 2007; Sullivan et Sundaram, 2012; Eichenwald, 2018). L'ensemble de ces prédispositions néonatales contribue de façon substantielle aux risques de distension mécanique du corps œsophagien (stimulus mécanique) et de remontée du liquide gastrique vers l'œsophage (stimulus chimique), soit les deux phénomènes possibles lors d'un RGO pouvant potentiellement entraîner des répercussions néfastes.

5.2. RGO et événements cardiorespiratoires en pédiatrie

Bien que généralement asymptomatique, un RGO prend un caractère pathologique avec la survenue de symptômes. Les connaissances actuelles suggèrent que les reflux gastriques, qui représentent un phénomène physiologique commun chez les nourrissons en bonne santé, peuvent parfois entraîner des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs comportant apnées,

bradycardies et hypoxie associées à des malaises sévères et probablement au SMSN chez les nouveau-nés à terme et prématurés. Ces réflexes inhibiteurs peuvent survenir lors de la stimulation des récepteurs œsophagiens durant un RGO. Néanmoins, bien que le RGO et les événements cardiorespiratoires soient tous deux des occurrences fréquentes chez les prématurés, leur relation est particulièrement controversée dans la littérature. La théorie selon laquelle les RGO peuvent jouer un rôle causal dans les événements cardiorespiratoires chez les prématurés repose, entre autres, sur l'existence de chémorécepteurs au niveau des voies aériennes supérieures capables de générer des chémoréflexes laryngés (Cresi et al., 2018). De nombreuses études ont été publiées sur la relation entre les RGO et les événements cardiorespiratoires en période néonatale, cependant les résultats rapportés sont contradictoires (Ramet et al., 1990; Ramet, 1994; Wenzl et al., 2001; Peter et al., 2002; Di Fiore et al., 2005; Mousa et al., 2005; Corvaglia et al., 2009; Slocum et al., 2009; Di Fiore et al., 2010; Nunez et al., 2011; Qureshi et al., 2015; Funderburk et al., 2016; Cresi et al., 2018; Nobile et al., 2019). Bien que certains auteurs aient démontré l'existence d'une relation temporelle entre les événements cardiorespiratoires et les RGO (Ramet et al., 1990; Ramet, 1994; Wenzl et al., 2001; Corvaglia et al., 2009; Nunez et al., 2011; Qureshi et al., 2015; Nobile et al., 2019), d'autres ont trouvé peu d'association (Mousa et al., 2005; Funderburk et al., 2016; Cresi et al., 2018) et certains ont rejeté cette hypothèse (Peter et al., 2002; Di Fiore et al., 2005; Slocum et al., 2009; Di Fiore et al., 2010).

Toutefois, de nombreuses limites peuvent expliquer la controverse et l'incohérence de cette relation dans la littérature telles que les diverses méthodes de mesure des RGO et des événements cardiorespiratoires et l'hétérogénéité des populations étudiées.

6. CHÉMORÉFLEXES LARYNGÉS ET PULMONAIRES

6.1. Chémoréflexes laryngés

Les CRL sont un groupe de réflexes stimulés par le contact entre un liquide et la muqueuse laryngée. Chez l'adulte et l'enfant en dehors de la période néonatale, ce contact provoque des réponses de protection des voies respiratoires inférieures comme des déglutitions, de la toux et une réaction d'éveil. Ces réflexes sont d'une importance cruciale dans la prévention d'une aspiration trachéale (St-Hilaire et al., 2007; St-Hilaire et al., 2008). En contrepartie, chez les mammifères nouveau-nés immatures, des études ont révélé que les conséquences des CRL peuvent s'avérer néfastes *via* une réponse inhibitrice vagale exagérée se manifestant sous la forme de laryngospasme (fermeture du larynx prolongée), d'apnées centrales prolongées, de bradycardies et de désaturations (Thach, 2001; St-Hilaire et al., 2007; Samson et al., 2018). Ainsi, des études comparatives chez des agneaux nouveau-nés prématurés et des agneaux nouveau-nés à terme ont particulièrement bien montré l'importance de l'immaturité à la naissance pour les CRL. En effet, l'injection de 0.5 mL d'HCl dans le larynx a déclenché des CRL avec une inhibition cardiorespiratoire beaucoup plus marquée chez les agneaux prématurés que les agneaux nés à terme (St-Hilaire et al., 2005; St-Hilaire et al., 2007). De façon similaire, l'instillation de petits bolus d'eau ou de salin (0.01 à 0.1 mL) dans le pharynx chez des nouveau-nés prématurés humains a entraîné des déglutitions répétées et des apnées avec fermeture des voies respiratoires (Davies et al., 1988; Pickens et al., 1988). En contrepartie, chez les nourrissons nés à terme, ces réponses étaient moins fréquentes et moins prolongées (Pickens et al., 1989).

Les chémoréflexes laryngés ont une implication clinique importante. Ils sont connus pour leur capacité à générer des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs potentiellement dangereux, surtout lors des premiers mois de vie où l'immaturité est plus importante (Thach, 2001; Thach, 2008). Cette réponse cardiorespiratoire inhibitrice reliée aux CRL peut être impliquée dans des malaises sévères du nourrisson (Praud, 2010) ou l'élément déclencheur d'une suite d'événements pouvant mener au SMSN (Leiter et Böhm, 2007; Reix, 2007).

Puisque les CRL ont fait l'objet de recherche détaillée, en particulier chez nos modèles ovins néonataux, il était pertinent de continuer l'investigation avec des reflux qui demeurent au niveau de l'œsophage (RGO) chez notre modèle d'agneau à terme (projet de maîtrise) et maintenant d'agneau prématuré (projet de doctorat) afin de déterminer si la prématurité entraîne une exagération des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs à point de départ œsophagien.

6.2. Chémoréflexe pulmonaire

Le chémoréflexe pulmonaire est un réflexe de défense induit *via* la stimulation des fibres C bronchopulmonaires (Coleridge et Coleridge, 1994). Il se définit par une inhibition cardiopulmonaire réflexe en deux phases : 1) une phase initiale caractérisée par une apnée centrale, une bradycardie et une hypotension artérielle systémique, 2) une seconde phase caractérisée par une tachypnée superficielle (Coleridge et Coleridge, 1994).

Dans la littérature, la capsaïcine est le composé le plus fréquemment utilisé afin d'étudier les fibres C bronchopulmonaires puisqu'elle stimule spécifiquement ces afférences. La stimulation des fibres C par la capsaïcine passe par l'activation des canaux TRPV1 (Ho et al., 2001). En effet, chez l'agneau à terme, l'injection par voie intraveineuse centrale (*via* l'artère jugulaire) de faibles doses (5-10 µg/kg) de capsaïcine permet la stimulation des fibres C et engendre un chémoréflexe pulmonaire (Diaz et al., 2000). En contrepartie, l'injection par voie sous-cutanée de très fortes doses de capsaïcine (25 mg/kg) chez l'agneau à terme est connue pour l'ablation (désensibilisation) de la fonction des fibres C (Diaz et al., 2000).

Chez les nouveau-nés à terme et prématurés, le chémoréflexe pulmonaire a une pertinence clinique importante puisqu'il agit à titre de réflexe de défense dans le maintien d'une oxygénation optimale en cas de détresse respiratoire (Diaz et al., 1999). En effet, les fibres C bronchopulmonaires sont stimulées dans diverses conditions néonatales telle que lors d'une acidose métabolique, une maladie pulmonaire inflammatoire ou une congestion pulmonaire (Nault et al., 1999).

7. VARIABILITÉ CARDIORESPIRATOIRE

Les systèmes respiratoire et cardiovasculaire sont des systèmes biologiques particulièrement complexes. Ils sont complexes tant dans le temps que dans l'espace et ils fonctionnent *via* un réseau dynamique interconnecté de boucles de régulation (Seely et Macklem, 2004). La vie est caractérisée par des rythmes; l'homéostasie n'étant pas statique, les fréquences respiratoire et cardiaque ne suivent pas la fréquence d'un métronome, bien au contraire, ils fluctuent au cours des cycles et varient dans le temps. Cette dynamique rythmique caractérise la notion de variabilité. Plusieurs méthodes ont été développées pour caractériser la variabilité de façon mathématique. Ces méthodes ont été utilisées dans des études démontrant que des systèmes biologiques sains possèdent des modèles de variabilité innée et complexe alors que la pathologie est associée à une variabilité altérée et une complexité réduite, c'est-à-dire à une simplification (Seely et al., 2014). Une variabilité réduite est synonyme d'une adaptabilité diminuée aux divers stimuli (Seely et Macklem, 2004). La variabilité cardiorespiratoire constitue donc un marqueur prometteur dans plusieurs états pathologiques et peut être évocatrice d'une anomalie. Entre autres, des altérations de la variabilité de la FC et de la FR sont souvent les premières manifestations dans la phase initiale du sepsis (Beuchee et al., 2009).

7.1. Variabilité de la fréquence cardiaque

Chez les humains et les animaux en santé, les facteurs déterminants de la FC interagissent afin d'assurer le fonctionnement adéquat du système cardiovasculaire. L'intervalle entre les battements cardiaques n'est pas constant, mais en évolution permanente, c'est ce qui caractérise l'état dynamique de l'homéostasie (Seely et Macklem, 2004). Les variations de la FC en fonction du temps sont déterminées par des interactions complexes entre divers systèmes de régulation (ex. FR, baroréflexe, température) (Fairchild et O'Shea, 2010). Cette variabilité entre les battements cardiaques est régulée *via* les branches sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome qui contribuent respectivement aux accélérations et aux ralentissements cardiaques. La variation de la FC, même en normoxie,

caractérise la variabilité de la fréquence cardiaque (VFC) qui se définit comme étant la variation dans le temps de la durée séparant deux battements cardiaques consécutifs, communément appelée l'intervalle RR (TaskForce, 1996).

Une VFC élevée est associée à un bon pronostic autant lors de conditions saines que pathologiques (Zulfiqar et al., 2010). En contrepartie, une VFC réduite est ponctuée de ralentissements cardiaques et est associée à une vulnérabilité aux facteurs de stress physiques et psychologiques et aux maladies (Shaffer et Venner, 2013; Kumar et al., 2020). Cela révèle, également, un déséquilibre du contrôle nerveux autonome de la FC qui peut prédire des effets indésirables (Dekker et al., 2000). Une VFC réduite est souvent un marqueur de troubles cardiovasculaires (ex. hypertension) et de déséquilibre autonome (ex. troubles anxieux, asthme et vulnérabilité à la mort subite du nourrisson) (Shaffer et Venner, 2013). Chez l'adulte, l'analyse de la VFC est d'un grand intérêt dans la pratique médicale et a largement été utilisée en clinique (Gasior et al., 2016), de manière non invasive, en tant que marqueur prédictif de la fonction autonome altérée dans diverses pathologies telles que l'hypovolémie (Triedman et al., 1993), l'hypertension artérielle (Pal et al., 2013) et l'infarctus du myocarde (Huikuri et Stein, 2013).

Chez les nourrissons prématurés en bonne santé, les accélérations et les ralentissements cardiaques reflètent une forte variabilité et témoignent d'un système nerveux autonome fonctionnel et adaptable à divers stimuli (Kumar et al., 2020). Le moniteur HeRO (moniteur d'index de la VFC) est le dispositif actuellement disponible sur le marché pouvant détecter une signature précoce de sepsis dans les unités de soins intensifs néonataux (Kumar et al., 2020). Le score HeRO intègre deux composantes de la FC, une diminution de la variabilité et des ralentissements, qui se produisent dans diverses conditions pathologiques, notamment en cas de sepsis. Le score HeRO a été conçu comme un système d'alerte précoce pour le sepsis. Ce dispositif permet d'identifier les irrégularités subtiles de la VFC (diminution de la VFC ponctuée de ralentissements cardiaques) qui se produisent des heures et des jours, entre autres, avant un sepsis. En effet, les cytokines inflammatoires, libérées précocement durant l'infection, ont

des conséquences dans tout le corps, y compris au niveau du cœur. Ainsi, durant la phase précoce de l'infection, des caractéristiques anormales de la FC peuvent être décelées *via* le moniteur HeRO. La surveillance actuellement disponible de la VFC s'est révélée très prometteuse pour la détection précoce d'un LOS chez les nouveau-nés prématurés (Griffin et al., 2005; Beuchee et al., 2009; Fairchild et O'Shea, 2010; Moorman et al., 2011; Fairchild, 2013; Bohanon et al., 2015; Joshi et al., 2019), avec une diminution notable du taux de mortalité de 20% (Fairchild, 2013). Cette approche est toutefois entravée par une faible spécificité, ce qui limite son utilité clinique. L'utilisation de méthodes d'analyse de la VFC avec une meilleure précision diagnostique est nécessaire afin d'améliorer davantage la détection précoce et le pronostic du LOS.

7.2. Variabilité de la fréquence respiratoire

Physiologiquement, comme la FC, la fréquence respiratoire (F_R) est variable dans le temps chez le sujet sain, c'est-à-dire que le temps entre deux cycles respiratoires consécutifs n'est pas constant. Cette fluctuation de la FR est attribuable aux signaux provenant des centres respiratoires bulbo-pontiques qui dictent la rythmogenèse respiratoire. Cette variation de la FR caractérise donc la variabilité de la fréquence respiratoire (VFR). Bien que la VFR soit moins étudiée et utilisée que la VFC, elle constitue un marqueur important qui précède souvent les manifestations cliniques de complications graves, telle que les infections des voies respiratoires (Garrido et al., 2018). Des altérations de la VFR ont été observées chez des patients atteints de comorbidités chroniques, telles que l'insuffisance cardiaque et la maladie pulmonaire obstructive chronique (Forleo et al., 2015). Toutefois, l'analyse de la VFR a été très peu étudiée en période néonatale.

7.3. Interrelations cardiorespiratoires

Puisque les systèmes respiratoire et cardiaque possèdent un objectif commun, soit d'assurer les échanges gazeux dans les cellules de l'organisme, ils doivent constamment interagir. Ils sont liés fonctionnellement et anatomiquement (*via* des interactions centrales et

périphériques) (Garcia et al., 2013). Ces nombreux liens sont synonymes d'interrelations cardiorespiratoires. Plusieurs interrelations cardiorespiratoires ont été décrites dans les articles qui seront présentés. Parmi celles-ci, uniquement l'arythmie sinusale respiratoire sera décrite au niveau physiologique.

Au repos, les intervalles entre les battements cardiaques chez les humains et les animaux présentent des fluctuations liées à la respiration, un phénomène connu sous le nom d'arythmie sinusale respiratoire (Hayano et al., 1996; Shafer et Venner, 2013). Plus précisément, la FC est dépendante du cycle respiratoire; elle augmente à l'inspiration et diminue à l'expiration, l'activité parasympathique étant diminuée pendant l'inspiration. Le premier mécanisme responsable de l'arythmie sinusale respiratoire est l'inhibition de l'activité vagale cardiaque efférente *via* l'inflation pulmonaire (Hayano et al., 1996; Hayano et Yasuma, 2003; Shafer et Venner, 2013). Lors de l'inspiration, la négativation de la pression intra-thoracique s'accompagne d'une baisse de la PA systémique qui stimule les barorécepteurs carotidiens et aortiques. Ces derniers induisent, *via* les centres bulbo-pontiques, une inhibition vagale expliquant l'augmentation de la FC. Le mécanisme inverse se produit lors de l'expiration entraînant une diminution de la FC (Hayano et Yasuma, 2003; Van de Louw et al., 2011). Un deuxième mécanisme reconnu pour générer l'arythmie sinusale respiratoire est la régulation directe des neurones préganglionnaires vagues cardiaques (noyaux ambigu et moteur dorsal du vague) par la commande respiratoire. Lors de l'expiration, les fibres efférentes vagues sont plus fortement excitées par les chémorécepteurs et les barorécepteurs artériels. Le potentiel de membrane des neurones préganglionnaires vagues cardiaques est hyperpolarisé à l'inspiration de par l'arrivée du potentiel postsynaptique inhibiteur induit par l'acétylcholine, ce qui diminue la sensibilité des neurones aux entrées excitatrices pendant l'inspiration (Hayano et Yasuma, 2003).

L'arythmie sinusale respiratoire constitue un marqueur biologique d'un état de bonne santé et serait bénéfique aux échanges gazeux pulmonaires (amélioration du transport de l'oxygène). En effet, une étude réalisée chez des chiens adultes anesthésiés a démontré que

les fluctuations de la FC en phase avec les volumes pulmonaires entraînent une amélioration significative de l'efficacité des échanges gazeux (Hayano et al., 1996). Ainsi, une diminution de l'arythmie sinusale respiratoire pourrait se traduire par une diminution de la force des interrelations cardiorespiratoires et diminuer l'efficacité des échanges gazeux au sein de l'organisme.

7.4. Méthode d'analyse de la variabilité cardiaque et respiratoire

L'analyse de la variabilité cardiaque et respiratoire requiert un enchainement de processus mathématiques. L'enregistrement continu de signaux physiologiques permet d'analyser l'activité cardiaque et respiratoire. L'électrocardiogramme (ECG) permet d'évaluer l'intervalle entre les battements cardiaques alors que la pléthysmographie respiratoire par inductance (non calibrée) permet d'estimer les variations de la durée des cycles respiratoires (au niveau du thorax et de l'abdomen). Bien évidemment, les animaux étant libres de leur mouvement, des artéfacts doivent être retirés afin de procéder aux différentes analyses de variabilité.

7.4.1. Analyse de la VFC

La VFC reflète l'adaptation du cœur aux stimuli internes et externes et est mesurée *via* la variation des intervalles RR du signal de l'ECG. Les intervalles RR correspondent au temps entre deux ondes R successives, soit le temps entre deux cycles cardiaques. Ainsi, les intervalles RR sont extraits de l'ECG et exprimés à partir d'un tachogramme montrant l'évolution de la durée des cycles cardiaques en fonction du temps (Figure 9) (Seely et Macklem, 2004).

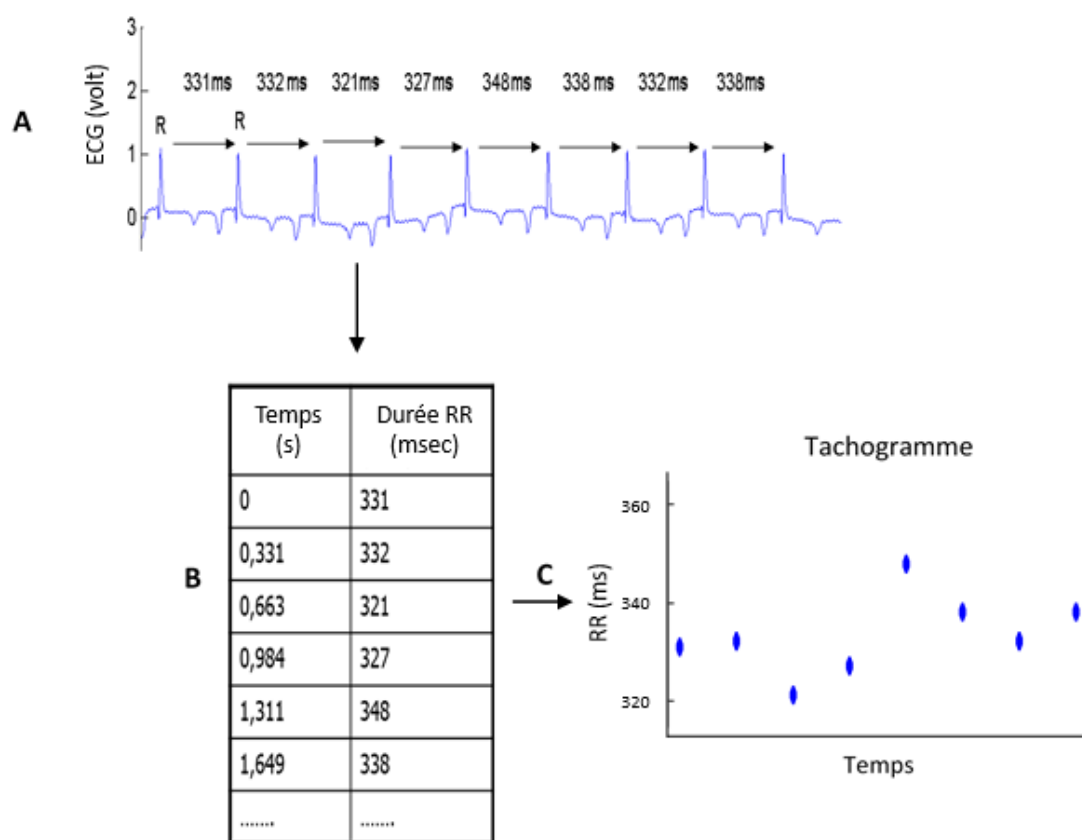


Figure 9. Exemple d'extraction de la durée des cycles cardiaques (intervalles RR). Les intervalles RR (temps entre deux battements cardiaques) sont extraits et exprimés à partir d'un tachogramme montrant l'évolution de la durée des cycles cardiaques en fonction du temps. Les analyses de la VFC sont effectuées à partir de ces séries temporelles. ECG, électrocardiogramme; RR, durée de l'intervalle entre 2 ondes R successives. Avec autorisation de reproduction du Dr Patrick Pladys.

Les analyses subséquentes de la VFC sont effectuées sur ces séries temporelles. Généralement, la VFC est étudiée sur des périodes stationnaires, sur lesquelles la majorité des analyses a été validée. La stationnarité dans la série temporelle RR est définie par la stabilité de la moyenne et de l'écart type du signal au cours de la période étudiée. La stationnarité des signaux physiologiques permet de caractériser davantage la condition du sujet, lorsque les influences de l'environnement sont limitées (Seely et Macklem, 2004). Par exemple, dans notre situation, les périodes non-stationnaires peuvent faire référence à des événements physiologiques (ex. apnées, réaction d'éveil) ou non (ex. interférences) qui entraînent une altération des signaux. De plus, il a été démontré que la non-stationnarité biaise

significativement de nombreux index de VFC (Magagnin et al., 2011). En pratique, la sélection des périodes stationnaires requiert tout d'abord le rejet d'artéfacts, ce qui permet d'éviter les segments présentant des altérations telles que celles observées lors d'une réaction d'éveil, une apnée ou un soupir. Une fois le rejet d'artéfacts effectué, un filtrage et lissage des signaux dénués d'artéfacts permet d'obtenir des séries temporelles d'intervalles RR nettoyées. Puis, un test de stationnarité sur ces séries temporelles RR permet de détecter les périodes stationnaires qui seront utilisées dans les analyses subséquentes (Seely et Macklem, 2004). Finalement, l'extraction des indices de la VFC requiert des analyses de variabilité linéaires et non linéaires qui sont réalisées sur ces séries temporelles et qui ont été choisies en tenant compte des résultats précédents sur le sepsis néonatal (Nguyen et al., 2017). Il est à noter que seules les méthodes utilisées dans mes études seront présentées.

7.4.1.1. Analyses linéaires

Les analyses linéaires de la VFC comprennent des analyses dans le domaine temporel et le domaine fréquentiel.

Domaine temporel

Dans le domaine temporel, les mesures effectuées font appel à des analyses simples permettant d'évaluer la variabilité (TaskForce, 1996). Les analyses statistiques du domaine temporel informe du degré de variation des intervalles RR autour de sa valeur moyenne (Shaffer et Venner, 2013). Elles comprennent principalement la moyenne (indice de la FC) et l'écart type (indice de la variabilité globale) de la durée des intervalles RR, le coefficient de variation (ratio de l'écart type sur la moyenne multiplié par 100) et le «*square root of the mean squared differences of successive RR intervals*» (rMSSD), qui donne un indice de la variabilité à court terme des différences de durée entre des battements successifs, reflétant principalement le contrôle parasympathique (TaskForce, 1996). Les analyses du domaine temporel constituent des approches grossières d'analyse la VFC (Van de Louw et al., 2011).

Domaine fréquentiel

Les analyses du domaine fréquentiel fournissent des mesures de l'amplitude des fluctuations des intervalles RR dans des bandes de fréquences prédéterminées *via* un signal d'oscillations sinusoïdales (TaskForce, 1996; Pladys et al., 2014). En appliquant un modèle autorégressif aux séries temporelles d'intervalles RR, un spectrogramme est obtenu ayant comme abscisse une échelle de fréquence (Hz) et en ordonnée une puissance spectrale (ms^2). L'analyse spectrale permet d'obtenir une courbe illustrant la puissance spectrale (amplitude de la variabilité) pour les différentes fréquences composant le signal. Deux bandes d'intérêt sont étudiées sur le spectrogramme, soit la bande basse fréquence (LF, *low frequency*) allant de 0.02 à 0.25 Hz et la bande haute fréquence (HF, *high frequency*) allant de 0.25 à 2 Hz (Beuchée et al., 2007). Ces bandes de fréquences diffèrent selon les sujets à l'étude et ont été adaptées à la physiologie des agneaux. Alors que les oscillations de haute fréquence reflètent les variations induites par la respiration sur le contrôle vagal cardiaque (= arythmie sinusale respiratoire), les oscillations de basse fréquence sont principalement influencées par le baroréflexe et reflètent à la fois le contrôle parasympathique et sympathique du nœud sinusal. Le rapport LF/HF est un index de la balance sympathovagale cardiaque; par exemple, un ratio LF/HF augmenté suggère un contrôle cardiaque plus sympathique et/ou moins vagal alors qu'un ratio LF/HF diminué suggère un contrôle cardiaque plus vagal et/ou moins sympathique (Seely et Macklem, 2004).

7.4.1.2. Analyses non linéaires

Les phénomènes non linéaires sont déterminés, entre autres, à partir d'interactions complexes des systèmes nerveux autonome et central. Les analyses non linéaires de la VFC permettent d'obtenir de l'information sur la physiologie et d'évaluer le risque de mort subite (TaskForce, 1996). Le diagramme de Poincaré, l'entropie échantillonnée, l'analyse des fluctuations redressées, les capacités d'accélération et de déclaration et le graphique de visibilité ont été sélectionnés comme méthodes d'analyse non linéaire.

Diagramme de Poincaré

Le diagramme de Poincaré représente la longueur de chaque cycle cardiaque (RR) en fonction du cycle précédent (RR-1) (Pladys et al., 2014). Dans le diagramme de Poincaré, la dispersion du nuage de points en forme d'ellipse permet une analyse géométrique de la VFC à court et à long terme. Le coefficient de variabilité à court terme (SD1) est le reflet de l'activité parasympathique dans le nœud sinusal, alors que le coefficient de variabilité à long terme (SD2) reflète à la fois l'activité sympathique et parasympathique dans le nœud sinusal.

Entropie échantillonnée

La complexité et la régularité des séries RR ont été évaluées en calculant l'entropie échantillonnée. Plus précisément, le degré de désordre aléatoire dans une série temporelle RR est mesuré *via* sa régularité et sa prédictibilité, c'est ce qui définit l'entropie échantillonnée (Pladys et al., 2014). Il a été démontré qu'une diminution de l'entropie échantillonnée est associée à un sepsis néonatal. En effet, une valeur élevée d'entropie reflète une forte irrégularité et une séquence imprévisible, alors qu'une faible entropie traduit une simplification excessive, soit une décomplexification avec perte d'adaptabilité à l'environnement (souvent accompagnée d'une augmentation de la régularité de la FC) (Pladys et al., 2014). Cette diminution de l'entropie est souvent associée aux pathologies.

Fluctuations redressées

Une VFC normale est déterminée par une structure fractale. Une structure fractale représente, en quelque sorte, une similitude interne, c'est-à-dire qu'elle est formée de structures semblables répétées. Une organisation fractale peut être illustrée par l'analogie des poupées russes qui s'emboîtent l'une dans l'autre et dont les figurines sont identiques à l'échelle près (= invariance d'échelle). Il a été démontré que des modifications significatives de l'organisation fractale accompagnées d'autres altérations de la VFC peuvent être liées au sepsis néonatal (Pladys et al., 2014). En effet, la perte de cette invariance d'échelle peut rendre une structure plus rigide et, par le fait même, moins modulable (Beuchée et al., 2012).

Dans les articles présentés, l'invariance d'échelle des séries temporelles RR a été testée par « *detrended fluctuation analysis* », en utilisant l'exposant de mise à l'échelle fractale α 1.

Capacité d'accélération et de déclaration

L'activité physiologique du cœur est contrôlée *via* les systèmes nerveux sympathique et parasympathique qui sont responsables respectivement de l'accélération et du ralentissement de la FC. Parmi les analyses non linéaires de la VFC, il est possible de définir les modulations du rythme cardiaque. Cette analyse, quantifiée *via* la capacité d'accélération et de décélération, fournit des indices sur les modulations liées à l'accélération et au ralentissement du cœur (Bauer et al., 2006). La capacité d'accélération est synonyme de modulations accélératrices (sympathique) alors que la capacité de décélération est synonyme de modulations décélératrices (parasympathique).

Graphique de visibilité

L'analyse de la VFC par graphique de visibilité a été récemment proposée pour la détection précoce du sepsis. Cette nouvelle analyse inclut la théorie des réseaux complexes (représentation graphique par réseau et l'analyse de ces réseaux) (Lacasa et al., 2008; Madl, 2016). Dans le cadre de l'analyse de la VFC, un graphique en réseau permet d'étudier les connexions observées à partir d'une série temporelle RR. Le réseau est formé de points (nœuds) et de lignes qui les joignent (branches). Le degré d'un nœud correspond au nombre de branches qui arrivent sur ce nœud (Figure 10).

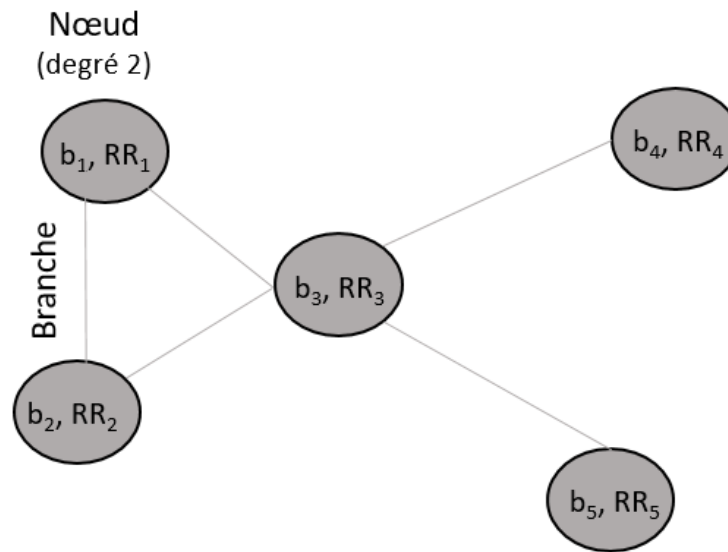


Figure 10. Exemple d'un graphipe simplifié à 5 nœuds et 5 branches. Chaque point est caractérisé par un doublet (b_i, RR_i) , b_i étant le $i^{\text{ème}}$ battement et RR_i l'intervalle RR précédent. Seuls deux nœuds de même degré sont connectés (b_1, RR_1) et (b_2, RR_2) . Les nœuds (b_4, RR_4) et (b_5, RR_5) ont le même degré mais ne sont pas connectés. Dans ce graphique, il y a 1 triangle (triplet fermé) et 8 triplets connectés (triplets ouverts). Avec autorisation de reproduction du Pr Guy Carrault.

Les connexions graphiques peuvent être verticales ou horizontales :

Analyse de visibilité horizontale

Pour l'analyse de visibilité horizontale, dans la série temporelle RR ci-dessous (Figure 11), chaque point est caractérisé par un doublet (t_i, y_i) , t_i étant le $i^{\text{ème}}$ battement et y_i l'intervalle RR précédent.

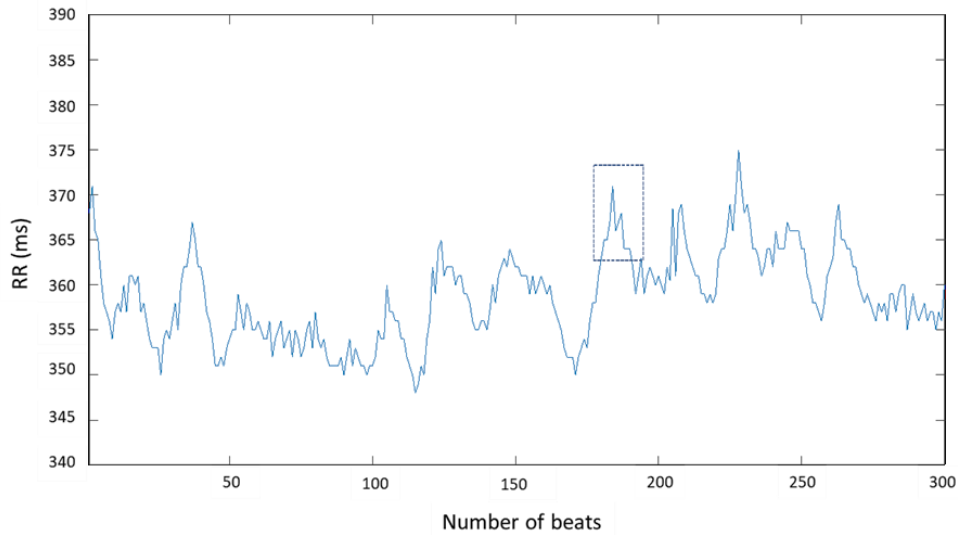


Figure 11. Représentation graphique d'une série RR. L'abscisse correspond au nombre de battements de la série temporelle et l'ordonnée correspond à la valeur de l'intervalle RR en millisecondes. Figure de Nault et al., 2020 (contenu en libre accès de *Frontiers in Physiology*).

Par souci de compréhension didactique, prenons, par exemple, l'extrait de l'encadré de la figure 11 et convertissons les valeurs des séries chronologiques de cet extrait en un graphique de visibilité horizontale associé que l'on considère comme un paysage (Figure 12). Deux valeurs de données arbitraires des séries temporelles (t_i, y_i) et (t_j, y_j) ont une visibilité dans ce paysage si d'autres données (t_k, y_k) observées entre elles ($t_i < t_k < t_j$) remplissent le critère de visibilité suivant: $\forall t_k \in [t_i, t_j]: y_i > y_k$ et $y_j > y_k$ (Nault et al., 2020).

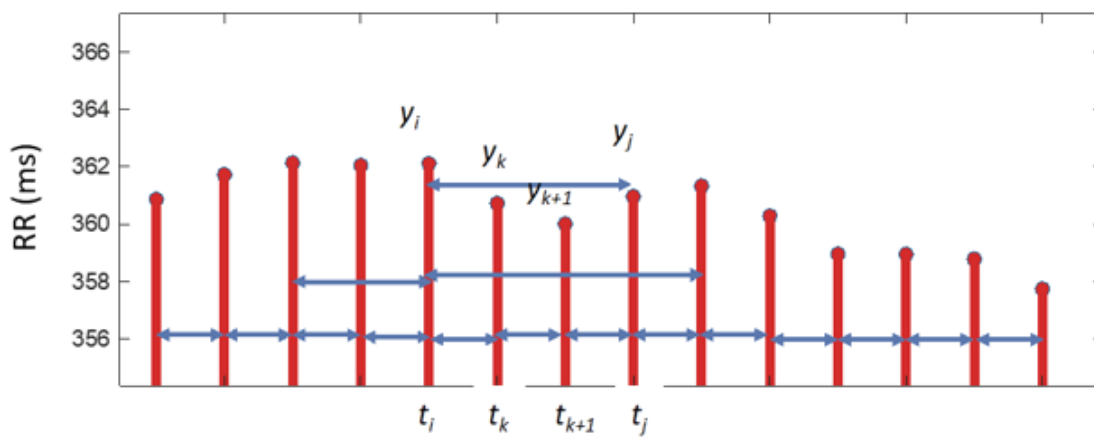


Figure 12. Graphique de visibilité horizontale associé à l'extrait de l'encadré de la figure 11. Figure de Nault et al., 2020 (contenu en libre accès de *Frontiers in Physiology*)

Cette analyse peut être appliquée à l'ensemble de la série temporelle RR de la figure 11 utilisant une fenêtre coulissante de 60 battements cardiaques, par exemple. Ainsi, un graphique en réseau peut être dessiné pour illustrer l'analyse de visibilité horizontale globale (Figure 13). Chaque point de données, dans la fenêtre coulissante, est transformé en nœud et connecté à tous les nœuds visibles. Un lien entre deux nœuds est représenté par une ligne (branche) dans toute la série temporelle (Nault et al., 2020).

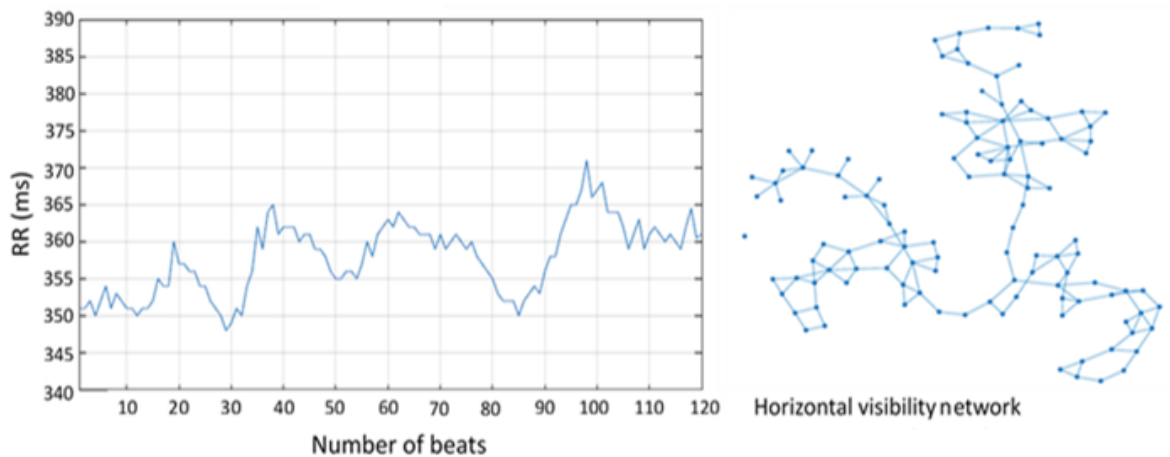


Figure 13. Graphique en réseau illustrant l'analyse de visibilité horizontale. Ce graphique illustre l'analyse de visibilité horizontale de toute la série chronologique de la figure 10. Figure adaptée de Nault et al., 2020 (contenu en libre accès de *Frontiers in Physiology*).

À partir de ce réseau, il est possible de déterminer le nombre de nœuds et le nombre de branches arrivant à un nœud (= le degré de ce nœud). Il est aussi possible de déterminer le nombre de triangles (= triplets fermés) et le nombre total de triplets (ouverts et fermés).

Analyse de visibilité verticale

Une analyse similaire à celle utilisée pour le graphique en réseau de visibilité horizontale est appliquée pour construire le graphique en réseau de visibilité verticale. Deux valeurs de données arbitraires des séries temporelles (t_i, y_i) et (t_j, y_j) sont visibles et deviendront des nœuds connectés si d'autres données (t_k, y_k) observées entre elles ($t_i < t_k < t_j$) remplissent le critère de visibilité suivant : $y_k < y_j + (y_i - y_j) \frac{t_j - t_k}{t_j - t_i}$ (Figure 14).

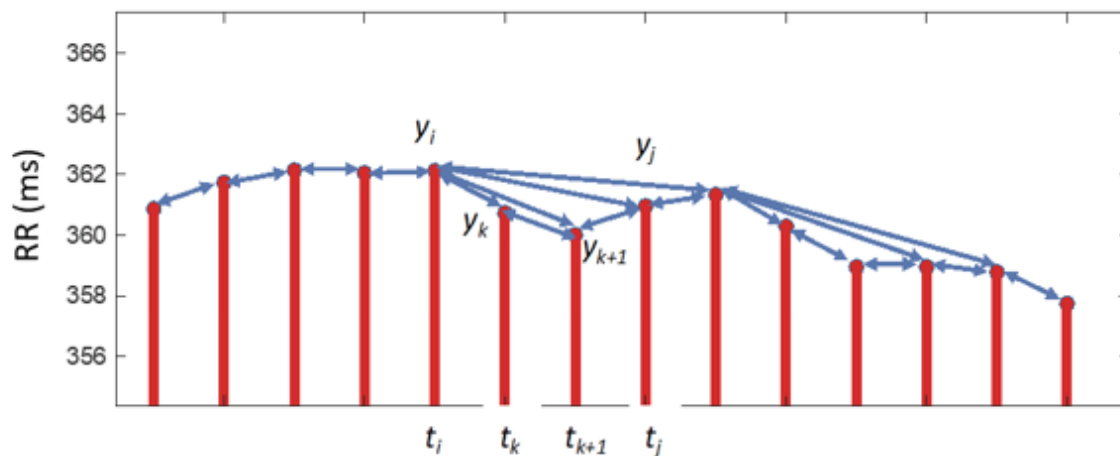


Figure 14. Graphique de visibilité verticale associé à l'encadré de la figure 11. Figure de Nault et al., 2020 (contenu en libre accès de *Frontiers in Physiology*).

Le reste de l'analyse est similaire à celui décrit pour l'analyse de visibilité horizontale afin d'obtenir un graphique en réseau illustrant l'analyse de visibilité verticale.

Variables utilisées pour caractériser la visibilité verticale et horizontale

Les trois variables utilisées pour caractériser la visibilité verticale (V) et horizontale (H) sont les suivantes: **(i)** La profondeur moyenne verticale et horizontale (V-MD et H-MD) qui quantifie la complexité du réseau, c'est-à-dire dans quelle mesure le graphique est un petit réseau géométrique (des valeurs faibles indiquent un réseau fermé pour obéir à la propriété du « petit monde » souvent associé à une forte variabilité); **(ii)** l'assortativité V et H, qui mesure la connectivité des nœuds ayant le même degré (des valeurs élevées sont une caractéristique du réseau « petit monde »); et **(iii)** la transitivity V et H, qui quantifie la connectivité globale au sein du graphique (la proportion de triangles fermés parmi tous les triplets possibles présents dans le graphique).

En bref, une série temporelle sans variabilité ne conduirait à aucune visibilité au-delà des voisins adjacents dans le réseau, et donc à une chaîne linéaire (grand diamètre et quelques nœuds centraux), alors qu'une forte variabilité conduirait à des graphiques fortement connectés avec une grande visibilité à l'intérieur du réseau (Madl, 2016).

7.4.2. Analyse de la VFR

Une certaine variabilité de la FR reflète la sensibilité du système aux stimuli externes et assure la stabilité du contrôle respiratoire. Cette VFR est mesurée *via* la somme des deux signaux obtenus au niveau du thorax et de l'abdomen (Figure 15).



Figure 15. Exemple de signaux obtenus par pléthysmographie respiratoire par inductance du thorax et de l'abdomen. La somme des deux signaux (RESP) représentant les variations du volume pulmonaire.

Cette somme des deux signaux représente le nouveau signal respiratoire (= RESP) qui reflète les variations de la durée des cycles respiratoires. Tout comme pour les intervalles RR de l'ECG, l'extraction des séries temporelles du signal RESP requiert le rejet des artéfacts, un filtrage et un lissage des signaux propres. Par la suite, un test de stationnarité est effectué sur les séries temporelles nécessaires au calcul des indices de la VFR, soit le temps inspiratoire (T_i), le temps expiratoire (T_e) et la durée totale du cycle respiratoire (T_{tot}). Il est à noter que les segments sélectionnés du signal RESP sont les mêmes que pour le signal de l'ECG. Parmi les trois séries temporelles extraites, le T_i est la différence entre le minimum et le maximum qui suit, le T_e est la différence entre le minimum et le maximum qui suit, puis le T_{tot} représente la somme de T_i et T_e (Figure 16). L'évolution de la FR est principalement étudiée à partir des séries temporelles T_{tot} .

Les analyses linéaires du domaine temporel décrites précédemment pour la VFC sont également applicables à l'analyse de la VFR et incluent la moyenne et l'écart-type. Les analyses non linéaires des séries temporelles T_i , T_e et T_{tot} qui ont été utilisées dans nos études incluent le diagramme de Poincaré (coefficient de variabilité à court et long terme) et l'entropie échantillonnée.

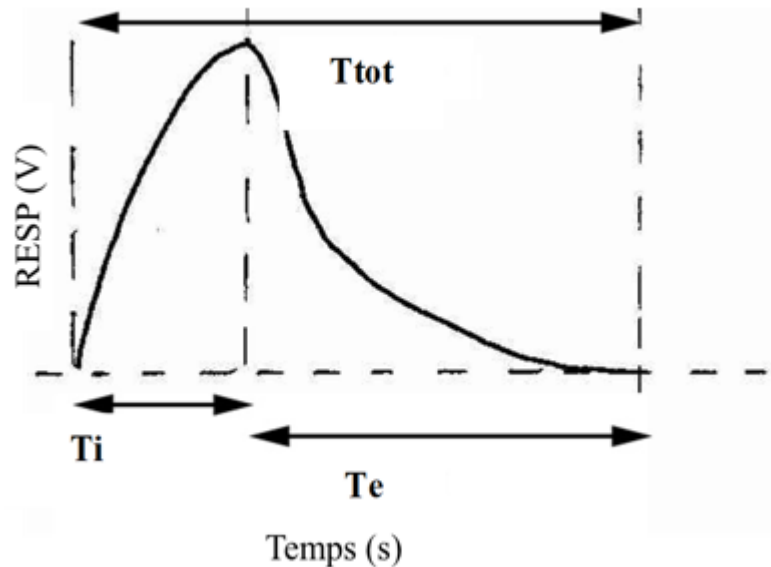


Figure 16. Extraction des trois séries temporelles du signal RESP. RESP, signal respiratoire; T_i , temps inspiratoire; T_e , temps expiratoire; T_{tot} , durée du cycle respiratoire. V, volt.

7.4.3. Analyse des interrelations cardiorespiratoires

Les interrelations cardiorespiratoires ont été évaluées entre les deux signaux RR et RESP. Les coefficients de corrélation linéaire de Pearson (r^2) et non linéaire (h^2), la cohérence de phase moyenne ($\gamma_{RR,RESP}$) et l'amplitude de l'arythmie sinusale respiratoire (différence entre le RR maximum et le minimum dans un cycle respiratoire) ont été calculés (Carroll et al., 2012). Ces analyses permettent, entre autres, de caractériser la présence ou l'absence d'une relation entre les deux variables. Ces analyses ne seront pas détaillées puisque la plupart consistent en des formules mathématiques complexes qui sont hors de mon champ d'expertise et du sujet de ma thèse.

8. PROGRAMME DE RECHERCHE DOCTORAL

Mon programme de recherche doctoral porte sur les altérations cardiorespiratoires lors de pathologies fréquemment rencontrées en période néonatale. L'objectif étant de mieux comprendre le contrôle néonatal respiratoire et cardiaque afin d'améliorer la prise en charge des apnées-bradycardies et de prévenir les malaises sévères et le SMSN. Ainsi, les projets de recherche présentés dans cette thèse permettent de mimer deux modèles de pathologies auxquels les nouveau-nés sont couramment exposés soit (1) la prématurité et (2) le sepsis bactérien. Par souci de compréhension didactique, je discuterai de chacun des articles séparément dans ma thèse.

8.1. Contexte et objectifs de mes projets de recherche doctoraux

8.1.1. Contexte et objectifs de l'article 1

Il est bien accepté, dans la littérature, que la stimulation des récepteurs laryngés, via un reflux laryngopharyngé, peut être à l'origine de manifestations cardiorespiratoires potentiellement dangereuses en période néonatale (St-Hilaire et al., 2005 et 2007). En contrepartie, les réflexes à point de départ œsophagien sont encore débattus à ce jour (Poets et Brockmann, 2011; Abu Jawdeh et Martin, 2013). Bien que quelques études chez l'animal nouveau-né (chiots et porcelets) (Schey et al., 1981; Jeffery et al., 1995; McKelvey et al., 2001) et chez le nouveau-né humain à terme (Wenzl et al., 2001; Nobile et al., 2019) et prématuré (Ramet et al., 1990; Ramet 1994; Corvaglia et al., 2009; Nunez et al., 2011; Nobile et al., 2019) aient montré que la stimulation de chémorécepteurs et/ou de mécanorécepteurs œsophagiens engendre des messages afférents vagues à l'origine de réflexes cardiorespiratoires, beaucoup d'inconnues demeurent sur ces réflexes surtout en période néonatale. Durant mes études de maîtrise, j'ai mis au point un modèle ovin permettant la caractérisation des manifestations cardiorespiratoires lorsqu'un reflux est mimé via une stimulation œsophagienne chez l'agneau à terme (n = 8). Ainsi, dans cet article, la caractérisation de l'inhibition cardiorespiratoire réflexe lors de stimulations œsophagiennes chez l'agneau à terme ainsi que l'implication des fibres C dans ces réflexes a fait l'objet de recherche lors de ma maîtrise. C'est pourquoi ces

deux objectifs ne seront pas abordés dans ma thèse. En contrepartie, durant mon doctorat, je me suis intéressée à l'effet de la prématurité ($n = 10$) sur cette inhibition cardiorespiratoire et à la comparaison avec l'agneau à terme. L'objectif général étant de mieux comprendre le lien entre les RGO et les réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs potentiellement impliqués dans les événements cardiorespiratoires des prématurés, les malaises sévères et le SMSN.

Hypothèse et objectifs

L'hypothèse principale de l'article 1 est que la naissance prématurée va entraîner une exagération des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs à point de départ œsophagien.

Les objectifs spécifiques de l'article 1 reliés à ma thèse sont donc de **(i)** caractériser les réflexes cardiorespiratoires et les mécanismes de protection provenant de l'œsophage lorsqu'un RGO est mimé à différents niveaux chez l'agneau prématuré, **(ii)** tester l'hypothèse selon laquelle la prématurité est responsable d'une exacerbation de l'inhibition cardiorespiratoire réflexe observée en réponse à la stimulation œsophagienne et **(iii)** déterminer quelles stimulations œsophagiennes induisent les réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs les plus marqués.

8.1.2. Contexte et objectifs de l'article 2

Le diagnostic précoce du LOS demeure très difficile pour les cliniciens en raison de la non-spécificité des premiers signes cliniques et de l'absence d'un marqueur idéal pour l'infection identifié à ce jour (Fanaroff et al., 1998). Il est pourtant crucial de prendre en charge rapidement les nouveau-nés atteints de LOS afin d'éviter des complications majeures (ex. lésions cérébrales et troubles développementaux) contribuant de façon significative à la mortalité infantile (Bentlin et Suppo de Souza Rugolo, 2010). La relation entre l'infection, les lésions cérébrales et les effets neurodéveloppementaux n'est pas entièrement élucidée à ce jour. Néanmoins, des études expérimentales chez un modèle murin néonatal indiquent que les cytokines pro-inflammatoires, lorsqu'administrées par voie systémique, peuvent être neurotoxiques et augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Dommergues et al., 2000). De plus, chez les enfants prématurés, l'infection entraîne

fréquemment une hypotension, une insuffisance respiratoire et une hypoxémie pouvant compromettre la circulation sanguine cérébrale, augmentant ainsi le risque de lésions cérébrales et de troubles neurodéveloppementaux (Stoll et al., 2004; Adams-Chapman et Stoll, 2006). Le développement du cerveau étant vulnérable aux lésions cytotoxiques et hypoxiques, un LOS expose les nouveau-nés à terme et prématurés à un risque accru de fonctionnement cognitif et moteur anormal.

Alors que les apnées-bradycardies sont souvent observées durant un LOS, des altérations plus subtiles de la variabilité cardiaque et respiratoire sont souvent les seules manifestations perceptibles au début du sepsis (Beuchée et al., 2009). Or, dans cet article, on s'intéresse à l'observation des manifestations cardiorespiratoires *via* l'injection de LPS chez l'agneau nouveau-né à terme afin de mimer l'inflammation systémique engendrée par un sepsis bactérien néonatal. L'objectif général est de mieux comprendre le lien entre le sepsis néonatal, l'inflammation et les altérations cardiaques et respiratoires en plus de trouver des pistes d'investigation pouvant aider les cliniciens dans la reconnaissance précoce qui pourrait améliorer le pronostic néonatal.

Hypothèse et objectifs

L'hypothèse principale de l'article 2 est que l'inflammation systémique induite par l'injection de LPS va entraîner des événements cardiorespiratoires inhibiteurs chez les agneaux nés à terme. **Les objectifs spécifiques** de l'article 2 ont donc pour but de mettre en place un modèle ovin nouveau-né à terme d'inflammation systémique *via* l'injection de LPS (n = 8) afin de **(i)** caractériser en détail les altérations cardiorespiratoires et les manifestations cliniques, **(ii)** évaluer si la réflexivité du système nerveux autonome a été modifiée en étudiant les composants cardiorespiratoires des chémoréflexes laryngés et pulmonaires (chez un second groupe d'animaux, n = 8) et **(iii)** fournir une preuve de concept que l'inflammation du tronc cérébral, près des centres de contrôle cardiorespiratoire, peut être montrée 6 heures post injection de LPS.

CHAPITRE 2- RÉSULTATS OBTENUS

Article 1. Reflex cardiorespiratory events from esophageal origin are heightened by preterm birth.

1.1. Avant-propos

Auteurs : Stéphanie Nault, Nathalie Samson, Charlène Nadeau, Djamal Djeddi, Jean-Paul Praud.

Statut de l'article : Publié.

Journal: *Journal of Applied Physiology*, 2017, volume 123, pages : 489-497.

Contributions : J'ai réalisé toutes les étapes menant à la rédaction de cet article, incluant l'élaboration du protocole de recherche, la mise au point du modèle animal, les chirurgies, les soins postnatals des agneaux prématurés, les enregistrements polysomnographiques, l'analyse des données, la préparation des figures et tableaux et l'écriture du manuscrit sous la supervision de mon directeur de recherche.

1.2. Résumé de l'article 1

Dans la littérature actuelle, la responsabilité des reflux gastro-œsophagiens dans les événements cardiorespiratoires des prématurés reste controversée. Alors que quelques études chez des animaux en période néonatale ont révélé que la stimulation des récepteurs œsophagiens entraîne des réflexes cardiorespiratoires, il reste beaucoup d'inconnues, surtout en condition de prématurité. Les objectifs de l'étude visaient à i) caractériser les réflexes cardiorespiratoires provenant des récepteurs œsophagiens chez les agneaux nés à terme et prématurés, ii) tester l'hypothèse selon laquelle la prématurité exacerbe l'inhibition cardiorespiratoire, iii) déterminer quelles stimulations œsophagiennes entraînent l'inhibition cardiorespiratoire la plus marquée et iv) déterminer l'implication des fibres C dans ces réflexes. Huit agneaux à terme et dix agneaux prématurés ont été étudiés. Suite à une instrumentation chirurgicale, une polysomnographie a été réalisée afin de surveiller en continu les variables à l'étude (ECG, respiration, pression artérielle systémique, activité des muscles constricteurs laryngés, stades de conscience et saturation en oxygène). De façon randomisée, cinq stimulations (inflation d'un ballonnet et/ou injection d'HCl) ont été effectuées à différents niveaux (proximal et/ou distal) de l'œsophage chez les 18 agneaux afin de mimer un reflux gastro-œsophagien. Vingt-quatre heures plus tard, une seconde polysomnographie a été réalisée chez les agneaux à terme seulement suite au blocage des fibres C *via* l'injection systémique de capsaïcine. Les résultats de cette étude ont confirmé que les stimulations œsophagiennes induisent des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs dont les plus importants surviennent lors de la stimulation simultanée des parties supérieures et inférieures (double stimulation) de l'œsophage chez l'agneau à terme et prématuré. Ces stimulations œsophagiennes ont aussi entraîné la survenue de mécanismes de protection (fermeture laryngée, déglutitions, toux, éveil) surtout chez les agneaux à terme. De plus, la prématurité a amplifié l'inhibition cardiorespiratoire et diminué la réactivité des mécanismes de protection (toux) chez les agneaux. En résumé, la stimulation œsophagienne induit des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs, qui sont en partie médiés par les fibres C et plus cliniquement pertinents chez les agneaux prématurés, surtout durant une double stimulation.

1.3. Article 1

Reflex Cardiorespiratory Events from Esophageal Origin Are Heightened by Preterm Birth

Stéphanie Nault¹, Nathalie Samson¹, Charlène Nadeau¹,
Djamal Djeddi^{1,2}, Jean-Paul Praud¹

¹Neonatal Respiratory Research Unit, Departments of Pediatrics and Pharmacology-Physiology, Université de Sherbrooke, QC, Canada

² Department of Pediatrics, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

Short title: Preterm birth and cardiorespiratory reflexes

Address for correspondence and proofs:

Jean-Paul Praud MD PhD
Departments of Pediatrics and Physiology
Université de Sherbrooke
QC, Canada, J1H 5N4
Email: Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca
Phone: (819) 346-1110, ext 14851
Fax: (819) 564-5215

Author contribution statement

SN, NS, DD and JPP conceived and designed the study. SN, NS and CN assured the initial care of the full-term and preterm lambs during the first 48h of life. SN and CN performed animal experiments. SN and CN analyzed the data. SN, NS, DD and JPP interpreted the results. SN prepared the figures. SN, NS and JPP drafted the manuscript. All authors revised, read and approved the final version of the manuscript.

ABSTRACT

The involvement of gastroesophageal refluxes in cardiorespiratory events of preterm infants remains controversial. While a few studies in full term newborn animals have shown that stimulation of esophageal receptors leads to cardiorespiratory reflexes, the latter remain largely unknown, especially after premature birth. The present study aimed to i) characterize the cardiorespiratory reflexes originating from esophageal receptors in newborn lambs, and ii) test the hypotheses that preterm birth enhances reflex cardiorespiratory inhibition and that C-fibers are involved in these reflexes. Eight full-term lambs and ten lambs born 14 days prematurely were studied. Following surgical instrumentation, a six-hour polysomnography was performed without sedation to record electrocardiogram, respiratory movements, arterial pressure, laryngeal constrictor muscle activity, state of alertness and hemoglobin oxygen saturation. Five esophageal stimulations of the upper and/or lower esophagus, including rapid balloon inflation and/or HCl injection, were performed in random order. A second recording was performed in full-term lambs 24h later, after C-fiber blockade by capsaicin. Results confirmed that esophageal stimulations induced inhibitory cardiorespiratory reflexes combined with protective mechanisms including laryngeal closure, swallowing, coughing, increased arterial pressure and arousal. Preterm birth heightened cardiorespiratory inhibition. The strongest cardiorespiratory inhibition was observed following simultaneous stimulation of the lower and upper esophagus. Finally, cardiorespiratory inhibition was decreased after C-fiber blockade. In conclusion, esophageal stimulation induces inhibitory cardiorespiratory reflexes, which are partly mediated by C-fibers and more pronounced in preterm lambs. Clinical relevance of these findings requires further studies, especially in conditions associated with increased cardiorespiratory events, e.g., neonatal infection.

KEYWORDS Gastroesophageal reflux; reflex cardiorespiratory events; preterm birth; C-fibers.

New & Noteworthy

- Preterm birth heightens the cardiorespiratory events triggered by esophageal stimulation
- The most extensive cardiorespiratory events are induced by simultaneous stimulation of the proximal and distal esophagus

INTRODUCTION

Immaturity of the overall nervous system predisposes newborn infants to suffer from disorders such as cardiorespiratory events in preterm infants, apparent life-threatening events (ALTE) and sudden infant death syndrome (SIDS). Current knowledge suggests that gastric refluxes, which represent a common physiological event in healthy infants, are sometimes involved in these disorders via inhibitory cardiorespiratory reflexes and defective protective mechanisms. While the responsibility of laryngeal chemoreflexes, which can be triggered during laryngopharyngeal refluxes, is widely acknowledged (19, 52, 53, 54, 56), the causal relationships between reflexes originating from the esophagus during gastroesophageal refluxes and cardiorespiratory events remain highly controversial in the neonatal period (18, 34, 37, 38, 54).

Esophageal receptors and associated reflexes have been the focus of several physiological studies. Indeed, it has been documented in animals as well as in full term or preterm infants that the stimulation of chemo- and mechanoreceptors of the esophagus can trigger various reflexes (10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 23, 24, 25, 26, 32, 51, 56). Moreover, the involvement of C-fibers, among others, in these reflexes has been suggested (25, 26). The above studies however have focused on reflexes modifying swallowing and/or esophageal function or those triggering bronchoconstriction and mucus production. Few physiological studies have addressed the possibility that esophageal stimulation can trigger cardiorespiratory events, especially in the neonatal period. Aside from beagle puppies where marked bradycardias were observed when a dilated balloon was slowly pulled through the esophagus or in response to upper esophageal distension (47), esophageal stimulations have been shown to induce mainly mild responses, namely cardiac decelerations or increased respiratory cycle duration in sleeping preterm infants ready for home discharge (40, 41) or in anesthetized piglets (20).

The aims of the present study conducted in lambs were to: i) characterize the cardiorespiratory reflexes originating from the esophagus upon mimicking of a

gastroesophageal reflux in the neonatal period; this included testing the hypothesis that different stimulations as well as different regions of the esophagus can have an effect on the characteristics of the reflexes; ii) test the hypothesis that preterm birth is responsible for enhancing the reflex cardiorespiratory inhibition observed in response to esophageal stimulation; iii) test the hypothesis that C-fibers are involved in these reflexes.

MATERIALS AND METHODS

The protocol of the study was approved by the Ethics Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke (protocol # 283-15).

Animals

The experiments were conducted in eight full-term lambs aged 4-5 days and weighing 3.6 ± 1 kg (2.3 to 4.6 kg) as well as ten preterm lambs aged 8 days and weighing 4.0 ± 1 kg (2.8 to 5.4 kg). Preterm lambs were born 14 days prematurely as previously described (2). Briefly, premature labor was induced by mifepristone (8 mg/kg intramuscularly) after stimulation of lung maturation by betamethasone (12 mg intramuscularly x 2). At birth, all preterm lambs were initially enrolled in a project on the effects of nasal continuous positive airway pressure on the introduction of bottle-feeding (44). The last ten preterm lambs of that initial study on bottle-feeding were included in the present study.

Neonatal ovine model of simulated gastroesophageal reflux

For the purpose of this study, a non-sedated ovine model of simulated gastroesophageal refluxes was designed in order to assess the inhibitory cardiorespiratory reflexes originating from esophageal receptors. A custom-made nasoesophageal catheter (Neurovent, Toronto, CA; length: 75 cm and diameter: 0.33 cm), comprised of two balloons (length: 2.5 cm and diameter with air: 1.3 cm) and two injections sites, was inserted into the esophagus of the animal. The distal balloon and injection sites were placed in the lower third of the esophagus, whereas the proximal balloon and injection sites were placed in the upper third of the esophagus. Correct placement of the esophageal catheter was validated by a chest x-ray before securing the catheter with an adhesive tape on the lamb's muzzle (figure 1). In order to refute the hypothesis that the observed cardiorespiratory responses could originate from laryngeal chemoreceptors, verification that methylene blue injected via the upper port of the catheter did not reach the larynx was confirmed in three of the studied lambs. In addition, verification that no HCl penetrated into the larynx during upper acid

instillation was also confirmed in three additional lambs using cineradiography (see digital supplement #1 for an example of a cineradiography acquisition).

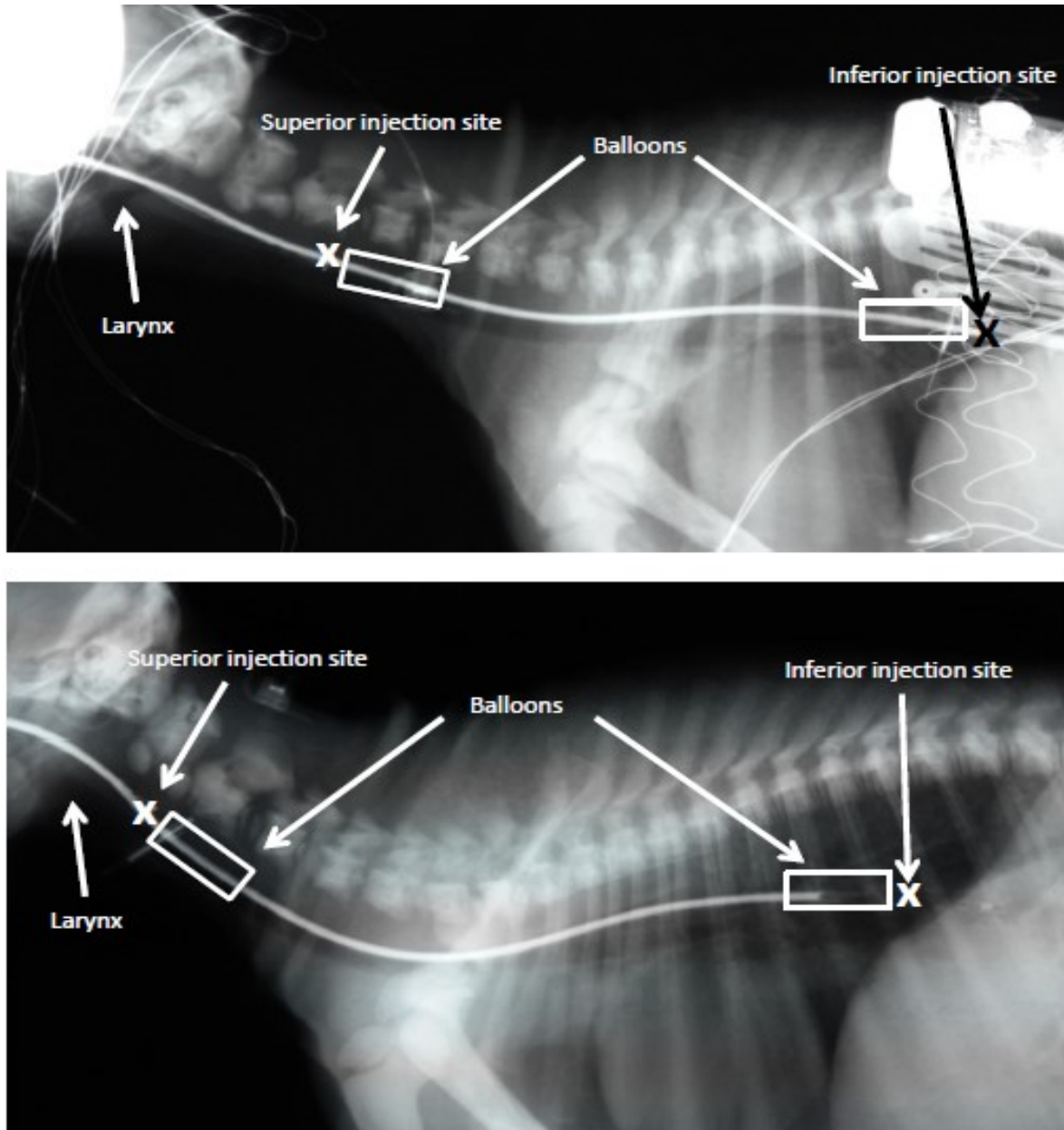


Figure 1. X-ray images showing nasoesophageal catheter placement in a full-term lamb (x, superior and inferior injection sites; □, balloon location). The superior injection site and balloon were placed in the upper one-third of the esophagus, whereas the inferior site and balloon were placed in the lower one-third. The catheter is completely (*top*) or partially (*bottom*) filled with radio-opaque barium solution.

Chronic instrumentation and recording equipment

Chronic surgical instrumentation was performed under general anesthesia (1-2% isoflurane, 30% O₂ and 68% medical air) in full-term lambs or under local anesthesia (ketamine 5 mg/kg + anafen 3 mg/kg intramuscularly and 2% lidocaine at incision sites) in preterm lambs. The procedure included insertion of i) custom-built bipolar electrodes into both thyroarytenoid (TA, a laryngeal constrictor) muscles for recording of electrical activity (EAta); ii) a catheter into the left carotid artery for monitoring systemic arterial blood pressure and for sampling arterial blood gases.

Instrumentation of the lamb was completed immediately before recordings and included i) needle electrodes inserted subcutaneously for electroencephalogram (EEG), electrooculogram (EOG) and electrocardiogram (ECG) recordings; ii) elastic bands installed on the chest and abdomen to monitor lung volume variations semi-quantitatively *via* respiratory inductance plethysmography; iii) a pulse oximeter probe placed at the base of the tail for continuous monitoring of oxygen hemoglobin saturation (SpO₂). Physiological signals were transmitted wirelessly and continuously recorded (42). Finally, the entire recording period was filmed with a webcam and an experimenter was present throughout the recording to note all events.

Design of the study

Full-term lambs

After a postoperative recovery period of 48h, two polysomnographic recordings were performed in non-sedated animals on two consecutive mornings, before and after C-fiber (CF) blockade. Accordingly, CFs were blocked in the afternoon following the first polysomnographic recording by a subcutaneous injection of 25 mg/kg of capsaicin (diluted in 10% Tween 80, 10% ethanol and 80% physiological saline) under a 30-min general anesthesia. The integrity of bronchopulmonary CFs was assessed by inducing pulmonary chemoreflexes by intravenous (IV) injections of 5 and 10 µg/kg capsaicin under intact CF

conditions, while effective CF blockade was verified by IV injections of 50 µg/kg capsaicin (5).

Five esophageal stimulations were performed twice (total of 10 per lamb) during NREM sleep in random order: 1) rapid balloon inflation (2 ml air x 10 seconds) in the upper esophagus; 2) rapid balloon inflation in the lower esophagus; 3) rapid injection of HCl (5 ml, pH 2) in the lower esophagus; 4) rapid injection of HCl (3 ml, pH 2) in the upper combined with balloon inflation in the lower esophagus (2 ml air); 5) rapid injections of HCl (3 ml x 2, pH 2) in both the upper and the lower esophagus. Each animal was given at least 15 min of recovery time between two stimulations. Events such as agitation, cough, arousal and/or full awakening were noted by an observer throughout the recording sessions. Finally, following completion of both recordings, euthanasia was performed by an IV injection of 90 mg/kg of pentobarbital sodium. Correct electrode and catheter positioning was systematically verified at necropsy.

Preterm lambs

After a postoperative recovery period of 24h, esophageal stimulations were performed during one polysomnographic recording identically to that performed in full-term lambs. The lambs were euthanized immediately after this recording, without performing CF blockade.

Data analysis

For each lamb, each of the five esophageal stimulations was repeated twice. Only the stimulation exhibiting the most marked inhibitory cardiorespiratory reflexes in each respective category was retained for subsequent analyses.

States of alertness

Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define NREM sleep. Cortical arousal from NREM sleep was defined by the association of a change in EEG

(decrease in amplitude + increase in frequency) of 3 s or more with at least two of the following modifications: a 10% increase in heart rate (HR) or a change in respiratory rate or movement. Full awakening was defined when the lamb was still awake after 1 min (3).

Cardiorespiratory responses

Data collection was performed over 10 seconds immediately before each esophageal stimulation (baseline) and continued over the next 60-second period. The inhibitory cardiorespiratory responses to each esophageal stimulation, which were calculated, respectively included (48): i) the percent decrease in HR; ii) the number of cardiac decelerations (defined as a decrease in HR greater than 30% for less than 5 s); iii) the number of bradycardias (defined as cardiac deceleration lasting at least 5 s); iv) the total duration of cardiac inhibition (including cardiac decelerations and bradycardias); v) the minimum HR; vi) the number and total duration of apneas (defined as at least two missed breaths); vii) the % decrease in O₂ saturation and viii) the minimum O₂ saturation. The occurrence times of the minimum HR and the minimum O₂ saturation were also analyzed.

Aside from the inhibitory cardiorespiratory responses, the percentage increase in mean arterial pressure (MAP), the maximum MAP, the number of swallows, the number of coughs, the total summed duration of laryngeal constrictor muscle activity and the presence of arousal or full awakening were computed.

Statistical analysis

Quantitative variables are expressed as median [quartile1 (Q1), quartile 3 (Q3)], while binary qualitative data (arousal and full awakening, yes / no) are expressed as relative frequency. Statistical analyses were performed on raw data for all variables. To assess the effect of the site of stimulation on inhibitory cardiorespiratory reflexes, a Friedman's test followed by a post-hoc analysis (Wilcoxon signed rank test) was performed. To assess the effect of gestational age and involvement of CFs, a Wilcoxon signed rank test was used. Finally, Fisher's exact test and a McNemar test (differences between each esophageal stimulation) were used to analyze arousal or full awakening. All statistical analyses were

performed with SPSS software (Armonk, NY, USA), except McNemar test, which was performed with SAS software (Cary, NC, USA). Differences were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Animals

The study was completed in eight full term lambs aged 4-5 days and weighing 3.6 ± 1 kg (2.3 to 4.6 kg) as well as ten preterm lambs aged 8 days and weighing 4.0 ± 1 kg (2.8 to 5.4 kg).

Characterization of reflexes from esophageal origin

Full-term lambs

As reported in table 1, amplitude of the reflexes was variable from one lamb to the other. Overall, esophageal stimulations triggered inhibitory cardiorespiratory reflexes and protective mechanisms. For single esophageal stimulations, cardiac decelerations as well as coughing and laryngeal closure reflex were observed mostly after upper esophagus distension. Only one apnea or bradycardia was observed in two lambs after a single stimulation. Double stimulations triggered the most significant reflexes, with apneas and/or bradycardias in 7/8 lambs, as well as a greater increase in mean arterial pressure and heightened swallowing activity compared to single stimulation.

Arousal was nearly always present during both upper and lower esophagus distension (single stimulations), but not during HCl injection. Full awakening occurred almost solely during double stimulations.

Preterm lambs

Overall, as shown in figures 2 and 3, premature birth heightened the reflexes triggered by esophageal stimulations. As presented in table 2, all types of esophageal stimulations induced apneas in some preterm lambs, their duration being more substantial with double stimulations. Heart decelerations were observed with all types of stimulations in some preterm lambs (not always in the same lambs as observed for apnea however) and were overall significantly greater than in full-term lambs. In full-term lambs, single upper esophageal distension induced cardiac decelerations as well as apneas, coughing and

laryngeal closure reflex (see figure 4). Bradycardias were present mainly for double stimulations and in 9/10 preterm compared to 5/8 full-term lambs. A decrease in SpO₂ was present in some lambs with all stimulations, culminating after double stimulations. An increase in mean arterial pressure was present in all preterm lambs with all stimulations.

Coughing and mostly swallowing activity were observed with double esophageal stimulations. As in full-term lambs, arousal was very frequent in response to single stimulation, except for HCl injection, whereas awakening was most often present with double stimulations.

Involvement of C-fibers on esophageal reflexes in full-term lambs

Overall, due to limited responses with single stimulations, significant differences were mostly observed with double stimulations. As reported in table 1, a significant decrease ($p \leq 0.03$) in post- vs. pre-desensitization was observed for the number of apneas and total apnea duration, as well as for the amplitude of cardiac decelerations for double HCl stimulations.

The effect of C-fiber blockade on the increase in mean arterial pressure, laryngeal closure duration, swallowing activity and coughing was variable from one stimulation to another. C-fiber blockade significantly enhanced the % increase in mean arterial pressure after upper esophagus distension ($p = 0.03$). No statistical difference was observed for the arousal and full awakening responses.

Table 1. Reflexes from esophageal origin and effect of C-fiber blockade in full-term lambs

	Upper distension		Lower distension		Lower HCl injection		Lower distension and upper HCl injection		Upper and lower HCl injection	
	Before CFs blockade	After CFs blockade	Before CFs blockade	After CFs blockade	Before CFs blockade	After CFs blockade	Before CFs blockade	After CFs blockade	Before CFs blockade	After CFs blockade
	Full-term n=8		Full-term n=8		Full-term n=8		Full-term n=8		Full-term n=8	
No. of apneas	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;1)	0 (0;0)	1 (0;1)	0 (0;0)**
Total apnea duration (s)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;5.4)	0 (0;0)	3.8 (0;4.8)	0 (0;0)**
% decrease HR	40 (1;54)	30 (7;46)	2 (0;28) [§]	13 (0;36)	3 (0;14) [§]	0 (0;0)	54 (34;64)	53 (24;60)	67 (49;70)	29 (0;50)**
No. of bradycardias	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	1 (0;2)	0 (0;0)	0 (0;1)	0 (0;0)
Total bradycardia durations (s)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	4 (0;16)	0 (0;0)	0 (0;10)	0 (0;0)
Occurrence time of min HR (s)	9 (0;11)	8 (7;9)	7 (5;9)	8 (6;10)	9 (5;49)	7 (4;13)	17 (8;27)	7 (7;5)	9 (8;16)	21 (12;31)
No. of cardiac decelerations	3 (1;5)	2 (1;3)	1 (0;1)	1 (0;1)	1 (0;1)	0 (0;0)	7 (4;10)	3 (2;5)**	4 (3;10)	4 (0;14)
Total cardiac inhibition duration (s)	3 (0.2;5.4)	1.8 (0.4;3.8)	0.6 (0;0.9)	0.3 (0;2.9)	0.2 (0;0.8) [†]	0 (0;0)	7 (2.2;22)	3 (0.9;6.2)	6.4 (2.8;15.6)	3.2 (0;10.8)
% decrease SpO ₂	3 (2;5)	2 (0;9)	2 (1;4)	1 (0;5)	3 (1;4)	1 (1;2)	4 (1;9)	2 (1;6)	3 (2;6)	8 (4;12)
Min SpO ₂ (%)	90 (79;94)	93 (83;97)	88 (83;93)	92 (85;93)	90 (89;93)	92 (88;94)	90 (82;92)	91 (88;93)	92 (88;93)	88 (81;90)
Occurrence time of min SpO ₂ (s)	26 (21;31)	27 (28;53)	18 (10;23)	33 (18;39)	32 (12;38)	24 (10;42)	40 (27;48)	29 (24;48)	42 (32;54)	52 (44;58)
No. of desaturations > 3 %	0 (0;1)	0 (0;1)	0 (0;1)	0 (0;1)	1 (0;1)	0 (0;0)**	1 (0;1)	0 (0;1)	1 (0;1)	1 (1;1)
No. of desaturations > 4 %	0 (0;1)	0 (0;1)	0 (0;0)	0 (0;1)	0 (0;0)	0 (0;0)	1 (0;1)	0 (0;1)	1 (0;1)	1 (0;1)
% increase MAP	28 (18;48)	47 (30;51)**	23 (15;33)	32 (16;62)	13 (8;24)	12 (8;16)	48 (27;66)	39 (28;50)	42 (34;51)	36 (25;44)
Max MAP (mmHg)	92 (83;121)	97 (89;100)	87 (81;99)	91 (77;103)	85 (78;96) [†]	78 (73;80)	105 (92;125)	95 (85;101)	104 (90;110)	92 (74;99)
Occurrence time of max MAP (s)	6 (5;8)	7 (7;10)	7 (5;16)	7 (5;8)	4 (3;6)	14 (5;25)	8 (6;16)	14 (7;24)	12 (10;16)	8 (7;17)
Total EAta duration (s)	6 (5;8)	5 (2;8)	1 (1;2) [§]	2 (1;3)	0 (0;0) [§]	1 (1;1)	8 (5;16)	13 (7;22)	15 (3;33)	11 (6;22)
No. of swallows	2 (1;4)	1 (0;3)	0 (0;1)	0 (0;1)	0 (0;2)	0 (0;0)	3 (0;7)	2 (0;2)	3 (1;7)	4 (1;7)
No. of coughs	2 (1;2)	2 (1;3)	0 (0;0) [§]	1 (0;1)	0 (0;0) [§]	0 (0;0)	2 (1;17)	3 (0;4)	5 (3;9)	6 (0;14)
Arousal	8/8 ^{‡§}	8/8	7/8 ^{‡§}	6/8	0/8 [†]	0/8	5/8 [§]	3/8	0/8	4/8
Full awakening	0/8 [§]	0/8	0/8 [§]	0/8	1/8 [§]	0/8	3/5 [§]	5/8	8/8	4/8

Results are presented as median (quartile 1, quartile 3); n = 8 full-term lambs for each group. CF, C-fibers; HR, heart rate; SpO₂, hemoglobin saturation; Min, minimal; Max, maximum; MAP, mean arterial pressure; EAta, electrical activity of the thyroarytenoid muscle. *P* < 0.05, ‡vs. lower HCl injection, †vs. lower distension + upper HCl injection, and §vs. upper + lower HCl injections. ***P* < 0.05 vs. before C-fiber blockade.

Table 2. Reflexes from esophageal origin in preterm lambs

	Upper distension	Lower distension	Lower HCl injection	Lower distension and upper HCl injection	Upper and lower HCl injection
	Preterm n=10	Preterm n=10	Preterm n=10	Preterm n=10	Preterm n=10
No. of apneas	1 (0;1)	1 (0;1)	1 (0;1)	2 (1;2)	2 (1;2)
Total apnea duration (s)	2.2 (0;6.5)	1.5 (0;4)	1.5 (0;4)	6.5 (4.6;12.1)	7.5 (5.4;10.9)
% decrease HR	46 (42;61)	48 (42;52)	37 (26;40) ^{†§}	63 (52;67)	64 (54;72)
No. of bradycardias	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	1 (0;2)	1 (0;2)
Total bradycardia durations (s)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	7.9 (0;20.3)	9 (0;15.7)
Occurrence time of min HR (s)	7 (5;9) [§]	5 (1;15) [§]	21 (10;40)	8 (2;29)	16 (9;23)
No. of cardiac decelerations	3 (1;4)	4 (1;7)	1 (0;1) [†]	8 (4;13)	5 (1;8)
Total cardiac inhibition duration (s)	3.2 (1.9;6.2)	3.3 (1;4.7)	0.2 (0;0.8) ^{†§}	28.2 (4.4;32.5)	10.6 (4;33)
% decrease SpO ₂	3 (1;4)	4 (2;7)	3 (1;6)	11 (2;15)	6 (4;12)
Min SpO ₂ (%)	87 (87;92)	87 (84;94)	87 (84;93)	82 (76;89)	85 (76;89)
Occurrence time of min SpO ₂ (s)	28 (23;40)	49 (17;53)	53 (16;55)	43 (36;44)	43 (24;57)
No. of desaturations > 3 %	0 (0;1)	1 (0;1)	0 (0;1)	1 (0;1)	1 (1;1)
No. of desaturations > 4 %	0 (0;0)	1 (0;1)	0 (0;1)	1 (0;1)	1 (0;1)
% increase MAP	22 (20;24) [§]	21 (13;27) [§]	17 (14;20) ^{†§}	42 (36;59)	53 (35;64)
Max MAP (mmHg)	85 (74;95) [§]	86 (75;93) [§]	80 (71;85) [§]	99 (87;116)	113 (89;124)
Occurrence time of max MAP (s)	7 (3;13)	9 (7;15)	7 (6;33)	10 (6;20)	12 (8;16)
Total EAtd duration (s)	3 (1;4)	3 (1;8)	2 (1;3) ^{†§}	6 (3;18)	8 (4;16)
No. of swallows	0 (0;1)	1 (0;4)	1 (0;3)	6 (1;6)	3 (1;5)
No. of coughs	0 (0;1)	0 (0;0) ^{†§}	0 (0;0) ^{†§}	4 (2;7)	4 (2;7)
Arousal	9/10 ^{†§}	8/10 [†]	0/10 [†]	5/10	3/10
Full awakening	1/10 [§]	1/10 [§]	3/10	5/10	7/10

Results are presented as median (quartile 1, quartile 3); n = 10 preterm lambs for each group. $P < 0.05$, †vs. lower HCl injection, ‡vs. lower distension + upper HCl injection, and §vs. upper + lower HCl injections.

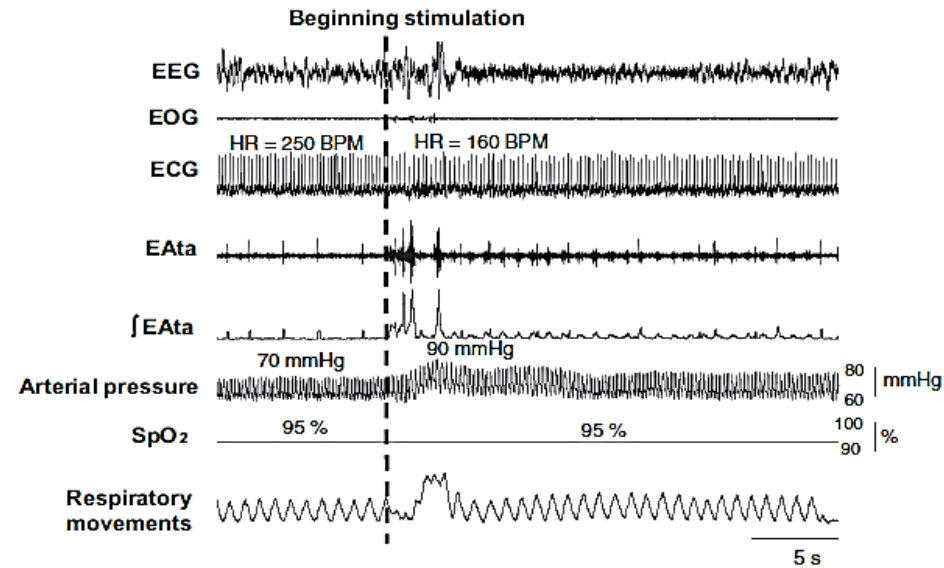
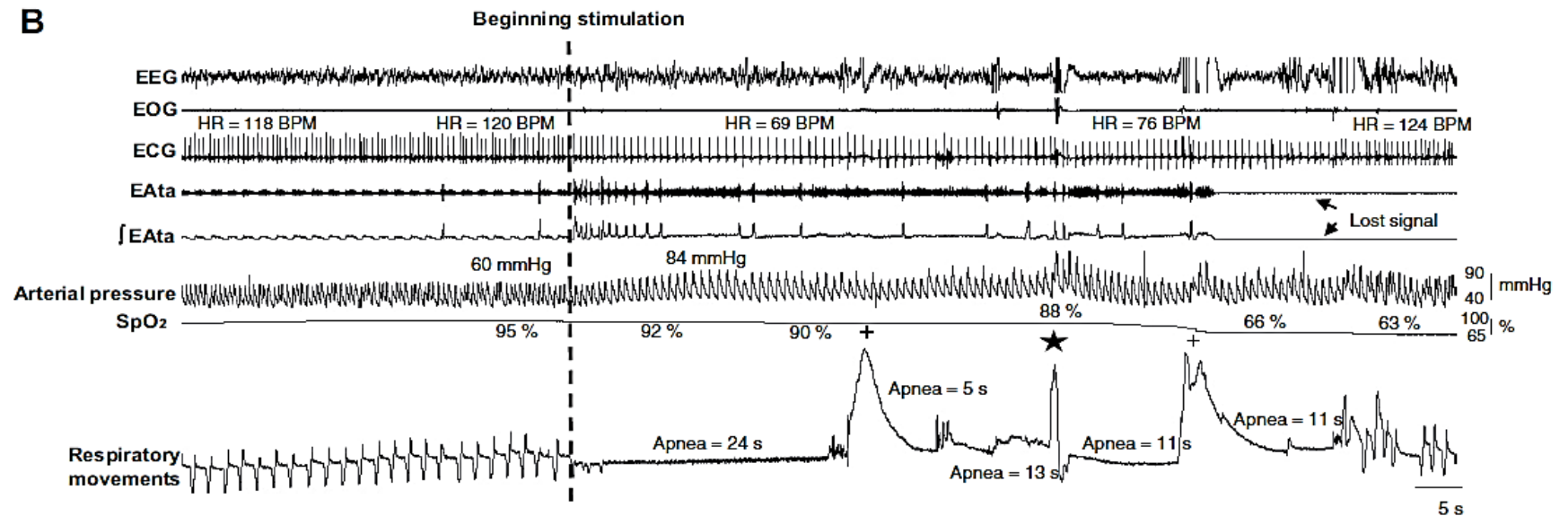
A**B**

Figure 2. Sample tracings showing cardiorespiratory inhibitory reflexes during simultaneous lower and upper HCl injection in one full-term (**A**) and one preterm (**B**) lamb. Heightened and clinically significant cardiorespiratory responses are observed in the preterm lamb. HR, heart rate; BPM, beats/min; EEG, electroencephalogram; EOG, electrooculogram; ECG, electrocardiogram; EAta, electrical activity of the thyroarytenoid muscle; \int EAta, moving time averaged EAta; SpO₂, oxygen hemoglobin saturation; respiratory movements, sum signal of the respiratory inductance plethysmography; ★, cough; +, body movements.

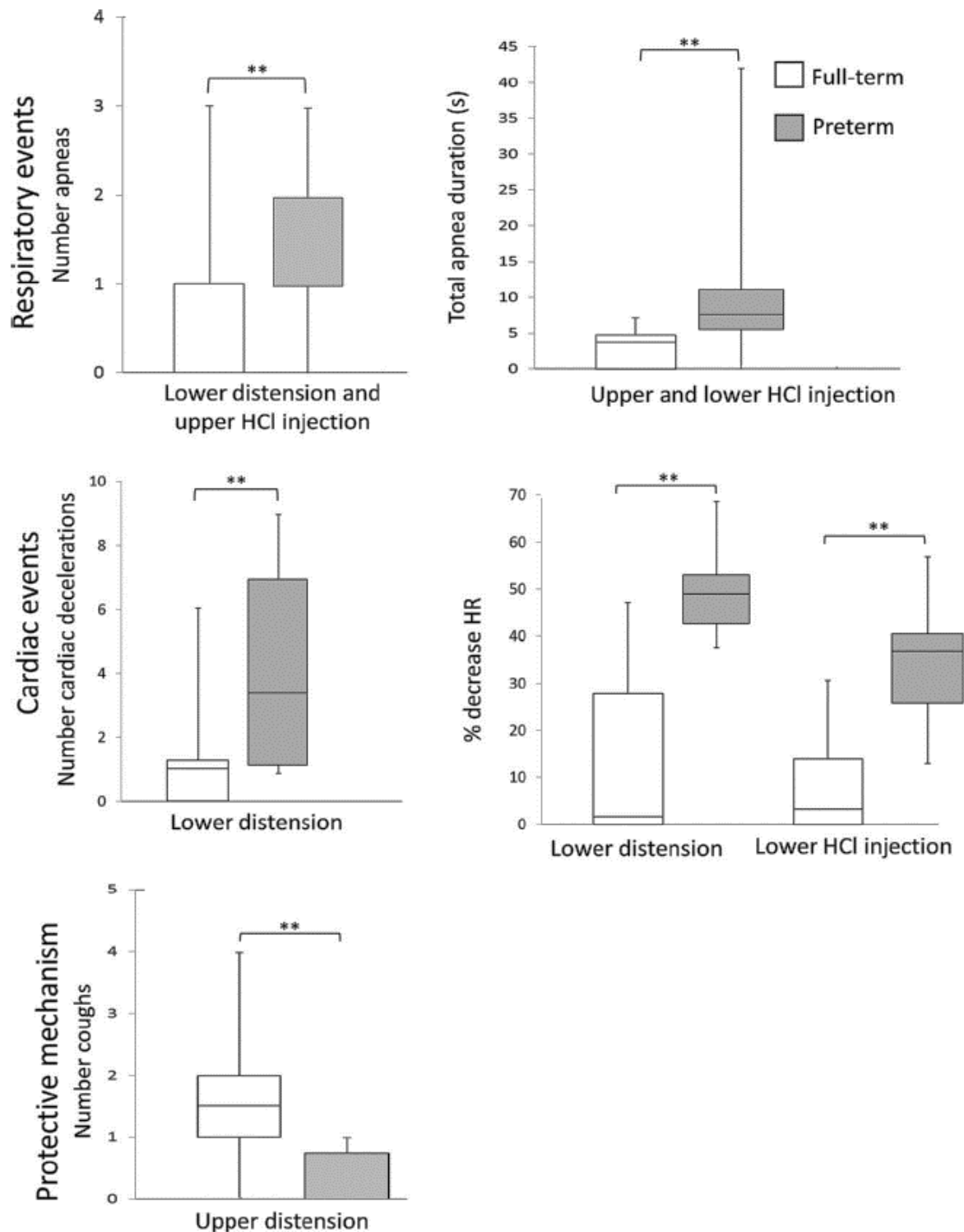


Figure 3. Preterm birth exacerbates the cardiorespiratory inhibitory reflexes, including the no. and total duration of apneas as well as the no. of cardiac decelerations and the %decrease in heart rate (4 graphs on top). Conversely, the no. of coughs (bottom) triggered by upper esophageal distension, which are considered part of protective mechanisms, is significantly decreased in preterm lambs. HR, heart rate. ** $P < 0.05$ preterm vs. full-term lambs.

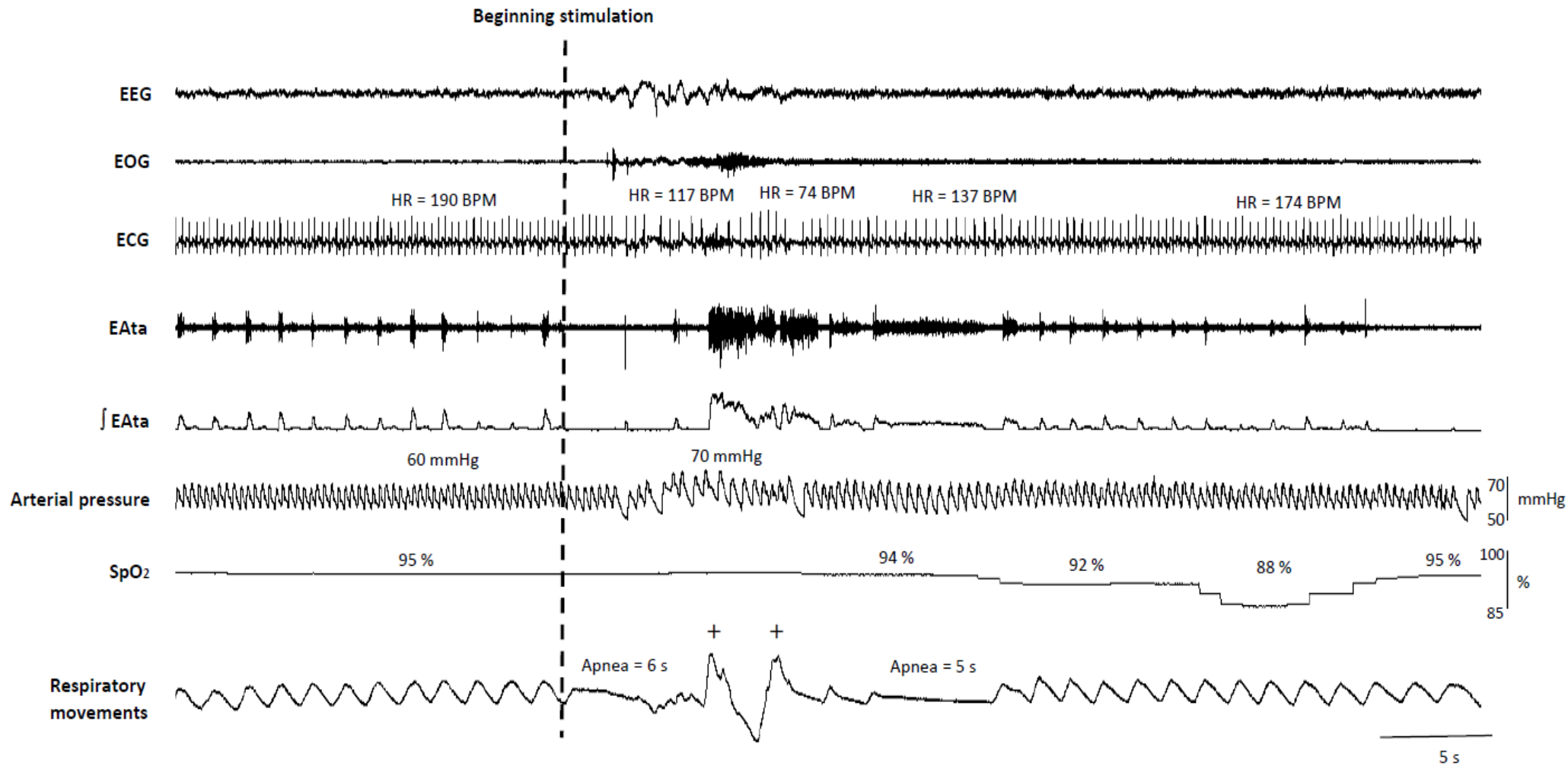


Figure 4. A single upper esophageal distension induces cardiac decelerations as well as apneas and laryngeal closure reflex in a premature lamb. See Figure 2 for abbreviations.

DISCUSSION

Overall, our findings reveal for the first time that the cardiorespiratory inhibition triggered by esophageal stimulation is heightened in preterm compared to full-term lambs. Furthermore, simultaneous stimulation of the proximal and distal esophagus, as observed during proximal gastroesophageal reflux, leads to greater cardiorespiratory inhibition than a single stimulation limited to either the proximal or distal esophagus. Finally, our results suggest that C-fibers are partly responsible for these cardiorespiratory reflexes.

Literature data on reflexes originating from the esophagus

Previous physiological studies have clearly shown that various reflexes can originate from the stimulation of esophageal mechanoreceptors and/or chemoreceptors. As summarized in a recent article, *“Esophageal distention or chemosensitive stimulation during GER events results in esophageal, pharyngeal, glottal, and laryngeal reflexes that protect the aerodigestive tract and prevent aspiration”* (46). Most studies, however, have primarily focused on understanding the alterations of esophageal function in response to gastroesophageal refluxes.

Reflexes triggered by mechanical stimulation. Studies in anesthetized or decerebrate adult cats have shown that slow esophageal distension leads to reflexes such as upper esophageal sphincter contraction, secondary peristalsis and lower esophageal sphincter relaxation, as well as to a pharyngeal swallow response. Conversely, it has been shown that rapid esophageal distension induces reflex relaxation of the upper esophageal sphincter and belching (23, 24, 26, 27), as well as active laryngeal closure (esophago-glottal closure reflex) (24, 26, 51).

Studies in humans have reported similar reflexes in response to slow esophageal distension in full-term and preterm infants (8, 11, 12, 15, 17) in addition to esophago-

glottal closure in response to rapid esophageal distension in adults as well as in full term (50) and preterm infants (13, 14).

Reflexes triggered by chemical stimulation. Studies in decerebrate adult cats have revealed that infusion of water or acid induces secondary peristalsis and the pharyngeal-swallow response (22, 27). Moreover, injection of acid into the esophagus has been shown to induce swallowing in full term piglets (32).

Studies in human preterm newborns have shown that water or apple juice infusion induces secondary peristalsis, swallowing, upper esophageal sphincter contraction and lower esophageal sphincter relaxation (11, 15, 17), as well as arousal (12).

Cardiorespiratory responses to esophageal stimulation have been mainly assessed in the neonatal period, albeit in only a few studies.

Studies in non-sedated, sedated or anesthetized newborn piglets born at term have reported apnea in response to acid infusion into the upper or the lower esophagus (19, 32), as well as cardiac decelerations (20). One study in beagle puppies aged 4-5 weeks has shown that acute esophageal dilatation can induce cardiac responses, which included cardiac arrhythmias, either supraventricular or ventricular, up to ventricular fibrillation and at times cardiovascular collapse (47). In preterm infants during REM sleep, distension or acid infusion into the lower esophagus has been observed to prolong both respiratory cycle duration and RR interval (40, 41).

Conversely to the cardiorespiratory inhibitory responses reported in the neonatal period, noxious esophageal stimuli have been shown to induce an increase in arterial blood pressure and heart rate in adult anesthetized or decerebrate rats, via both a sympathetic and a vagal pathway (30, 36).

New knowledge revealed by the present study

Results of the present study on cardiorespiratory reflexes from esophageal origin are reminiscent of our previous observations on laryngeal chemoreflexes in preterm vs. full-term lambs (52, 53). Immaturity of the brainstem cardiorespiratory “controllers” (6), perhaps with increased esophageal receptor sensitivity and/or immature control by higher brain centers (48), is likely involved in the heightened inhibitory responses observed in preterm lambs. Moreover, the observation that double stimulations induced the most powerful inhibition may be related to the summative effect of simultaneous stimulation of the distal and proximal esophagus. While not contradictory, our results however do not yield evidence to support results in adult humans suggesting heightened sensation of the proximal compared to the distal esophagus (57, 58).

Our results also demonstrate that esophageal stimulation elicits airway protective reflexes such as i) swallowing and arousal; ii) glottal closure, similar to that triggered by rapid esophageal distension in adults and infants (13, 14, 50); and iii) coughing. Interestingly, these airway protective mechanisms were observed in some lambs following upper esophageal distension only (not HCl injection), proving that they can originate from the esophagus. This is probably related to the common embryonic origins of the digestive and respiratory tract with a shared vagal innervation (9, 31).

Finally, esophageal stimulation induced an increase in mean arterial pressure in all lambs, due to sympathetic activation. In fact, similarly to the laryngeal chemoreflexes (1, 52, 53), esophageal stimulation is responsible for a sympathovagal coactivation, which undergoes a developmental maturation. Indeed, while the vagal component (apnea, bradycardia) predominates in preterm compared to full term lambs, the sympathetic component is prominent in adult mammals (30, 36).

Involvement of C-fibers

Our present results suggest that C-fibers are partly involved in the cardiorespiratory reflexes originating from the esophagus, as suggested previously for other esophageal reflexes (24, 26). It is known that the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), present on C-fibers, is activated by a large array of noxious agents, such as extracellular H^+ ions and rapid air distension (4, 28, 42). Our results show that the cardiorespiratory inhibition induced by double esophageal stimulation was blunted by selective blockade of C-fibers. The overall message is however less clear for the other components of the reflexes, especially mean arterial pressure and cough. We believe this reflects the fact that only TRPV1 were blocked, leaving numerous other esophageal receptors still functional (see table 1 in 30 for entire list).

Potential clinical relevance of the present physiological results

There is general agreement that laryngopharyngeal refluxes can be responsible for some cases of cardiorespiratory events in preterm infants as well as apparent life-threatening events and probably sudden infant death syndrome (reviewed in 29, 38, 55). Conversely, studies in preterm infants have led to diverse interpretations with regard to the causal relationships between gastroesophageal refluxes and events (18, 37, 38, 49). Available studies in this latter population are scarce and have used sedation/anesthesia and/or did not include sufficiently immature newborns (19, 20, 32, 47). Although any translation to human infants must be considered with great caution, our unique results support the view that gastroesophageal reflux could be responsible for cardiorespiratory events in preterm infants or infants with apparent life-threatening events (7, 48). Conditions featuring abnormal esophageal motility, e.g. due to prematurity (35) or esophagitis (48), could favor such occurrence by increasing the contact time of a refluxed bolus with esophageal receptors.

Limitations of the study

The present study has several limitations. First, esophageal stimulations were performed only during sleep. Given that cardiorespiratory events in preterm infants are more often related to gastroesophageal reflux during wakefulness (39), further studies will need to include awake preterm lambs. Secondly, given that the majority of refluxes in newborns are weakly acid (43), further studies in lambs will have to assess the effects of a weakly-acid liquid stimulus. Finally, an important limitation of our study is the lack of documentation in all studied lambs that the HCl injected in the upper esophagus did not penetrate into the larynx, inducing in turn laryngeal chemoreflexes (vs. esophageal chemoreflexes). This non-penetration was nevertheless confirmed in 3 lambs using methylene blue as well as in 3 additional lambs via cineradiography, thus leaving this possibility unlikely. In addition, the observation that a distention strictly limited to the upper esophagus triggered apneas constitutes clear evidence that a stimulation restricted to the esophagus can induce clinically significant cardiorespiratory reflexes.

CONCLUSION

Esophageal stimulation triggers heightened cardiorespiratory events in preterm compared to full term lambs, probably due to the overall immaturity of the nervous system. The most clinically significant events are induced by simultaneous stimulation of the proximal and distal esophagus. Although any translation to human newborns must be made with great caution, we propose that the present physiological results obtained in lambs justify further testing the hypothesis that gastroesophageal refluxes can trigger cardiorespiratory events in certain preterm infants and under certain conditions. Forthcoming studies will however need to first ascertain that each and every stimulation is restricted to the esophagus while excluding any laryngeal penetration.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the help of Marie-Pierre Garant, Biostatistics Division, Research Center of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CRCHUS) and Dre Marie Bussi res, ENT surgeon, for her help in the interpretation of upper airway cineradiography. JP Praud is the holder of the Canada Research Chair in Neonatal Respiratory Physiology and a member of the CRCHUS. The study was funded by the Canadian Institutes of Health Research.

REFERENCES

1. **Beuchée A, Nsegbe E, St Hilaire M, Carrault G, Branger B, Pladys P, Praud JP.** Prolonged dynamic changes in autonomic heart rate modulation induced by acid laryngeal stimulation in non-sedated lambs. *Neonatology* 91: 83-91, 2007.
2. **Boudaa N, Samson N, Carrière V, Germim PS, Pasquier JC, Bairam A, Praud.** Effects of caffeine and/or nasal CPAP treatment on laryngeal chemoreflexes in preterm lambs. *J Appl Physiol* 114: 637-646, 2013.
3. **Carreau AM, Patural H, Samson N, Doueik AA, Hamon J, Fortier PH, Praud JP.** Effects of simulated reflux laryngitis on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J Appl Physiol* 111: 400-406, 2011.
4. **Coleridge HM, Coleridge JC.** Pulmonary reflexes: neural mechanisms of pulmonary defense. *Annu Rev Physiol* 56: 69-91, 1994.
5. **Diaz V, Dorion D, Renolleau S, Létourneau P, Kianicka I, Praud JP.** Effects of capsaicin pretreatment on expiratory laryngeal closure during pulmonary edema in lambs. *J Appl Physiol* 86: 1570-1577, 1999.
6. **Di Fiore JM, Poets CF, Gauda E, Martin RJ, Macfarlane P.** Cardiorespiratory events in preterm infants: etiology and monitoring technologies. *J Perinatol* 36: 165-171, 2016.
7. **Gomes H, Lallemand P.** Infant apnea and gastroesophageal reflux. *Pediatr Radiol* 22: 8-11, 1992.
8. **Hill CD, Jadcherla SR.** Esophageal mechanosensitive mechanisms are impaired in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr* 162: 976-982, 2013.
9. **Houghton LA, Lee AS, Badri H, DeVault KR, Smith JA.** Respiratory disease and the esophagus: reflux, reflexes and microaspiration. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13: 445-460, 2016.
10. **Ishikawa T, Sekizawa SI, Sant'Ambrogio FB, Sant'Ambrogio G.** Larynx vs. esophagus as reflexogenic sites for acid-induced bronchoconstriction in dogs. *J Appl Physiol* 86: 1226-1230, 1999.
11. **Jadcherla SR, Shubert TR, Malkar MB, Sitaram S, Moore RK, Wei L, Fernandez S, Castile RG.** Gestational and postnatal modulation of esophageal sphincter reflexes in human premature neonates. *Pediatr Res* 78: 540-546, 2015.
12. **Jadcherla SR, Parks VN, Peng J, Dzodzomenyo S, Fernandez S, Shaker R, Splaingard M.** Esophageal sensation in premature human neonates: temporal relationships and

- implications of aerodigestive reflexes and electrocortical arousals. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G134-144, 2012a.
13. **Jadcherla SR.** Pathophysiology of aerodigestive pulmonary disorders in the neonate. *Clin Perinatol* 39: 639-654, 2012b.
 14. **Jadcherla SR, Gupta A, Coley BD, Fernandez S, and Shaker R.** Esophagoglottal closure reflex in human infants: a novel reflex elicited with concurrent manometry and ultrasonography. *Am J Gastroenterol* 102: 2286-2293, 2007.
 15. **Jadcherla SR, Hoffmann RG, Shaker R.** Effect of maturation of the magnitude of the mechanosensitive and chemosensitive reflexes in the premature human esophagus. *J Pediatr* 149: 77-82, 2006a.
 16. **Jadcherla SR.** Upstream effect of esophageal distention: effect on airway. *Curr Gastroenterol Rep* 8: 190-194, 2006b.
 17. **Jadcherla SR, Duong HQ, Hoffmann RG, Shaker R.** Esophageal body and upper esophageal sphincter motor responses to esophageal provocation during maturation in preterm newborns. *J Pediatr* 143: 31-38, 2003.
 18. **Jawdeh EG, Martin RJ.** Neonatal apnea and gastroesophageal reflux (GER): is there a problem? *Early Hum Dev* 89 Suppl 1: S14-S16, 2013.
 19. **Jeffery HE, Page M, Post EJ, Wood AK.** Physiological studies of gastro-oesophageal reflux and airway protective responses in the young animal and human infant. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 22: 544-549, 1995.
 20. **Kenigsberg K, Griswold PG, Buckley BJ, Gootman N, Gootman PM.** Cardiac effects of esophageal stimulation: possible relationship between gastroesophageal reflux (GER) and sudden infant death syndrome (SIDS). *J Pediatr Surg* 18: 542-545, 1983.
 21. **Lang IM, Haworth ST, Medda BK, Forster H, Shaker R.** Mechanisms of airway responses to esophageal acidification in cats. *J Appl Physiol* 120: 774-83, 2016.
 22. **Lang IM, Medda BK, Jadcherla SR, Shaker R.** Characterization and mechanisms of the pharyngeal swallow activated by stimulation of the esophagus. In press, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. doi: 10.1152/ajpgi.00291.2016.
 23. **Lang IM, Shaker R.** Mechanism of UES relaxation initiated by gastric air distension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307: G452-G458, 2014.
 24. **Lang IM, Medda BK, Shaker R.** Differential activation of medullary vagal nuclei caused by stimulation of different esophageal mechanoreceptors. *Brains Res* 1368: 119-133, 2011.

25. **Lang IM, Haworth ST, Medda BK, Roerig DL, Forster HV, Shaker R.** Airway responses to esophageal acidification. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R211-R219, 2008.
26. **Lang IM, Medda BK, Shaker R.** Mechanisms of reflexes induced by esophageal distension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G1246-G1263, 2001.
27. **Lang IM, Medda BK, Ren J, Shaker R.** Characterization and mechanisms of the pharyngo-esophageal inhibitory reflex. *Am J Physiol* 275: G1127-1136, 1998.
28. **Lee LY, Pisarri TE.** Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respir Physiol* 125: 47-65, 2001.
29. **Leiter JC, Böhm I.** Mechanisms of pathogenesis in the sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 159:127-138, 2007.
30. **Loomis CW, Yao D, Bieger D.** Characterization of an esophagocardiovascular reflex in the rat. *Am J Physiol* 272: R1783-1791, 1997.
31. **Madanick RD.** Management of GERD-related chronic cough. *Gastroenterol Hepatol* 9: 311-313, 2013.
32. **McKelvey GM, Post EJ, Wood AK, Jeffery HE.** Airway protection following simulated gastro-oesophageal reflux in sedated and sleeping neonatal piglets during active sleep. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 533-539, 2001.
33. **Miwa H, Kondo T, Oshima T, Fukui H, Tomita T, Watari J.** Esophageal sensation and esophageal hypersensitivity - Overview from bench to bedside. *J Neurogastroenterol Motil* 16: 353-362, 2010.
34. **Nunez J, Cristofalo E, McGinley B, Katz R, Glen DR, Gauda E.** Temporal association of polysomnographic cardiorespiratory events with GER detected by MII-pH probe in the premature infant at term. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 52: 523-531, 2011.
35. **Omari TI, Miki K, Fraser R, Davidson G, Haslam R, Goldsworthy W, Bakewell M, Kawahara H, Dent J.** Esophageal body and lower esophageal sphincter function in healthy premature infants. *Gastroenterology* 109: 1757-1764, 1995.
36. **Pickering M, Campion D, Jones JF.** Reflex cardiorespiratory effects of nociceptive esophageal distension in the decerebrate rat. *Exp Physiol* 87: 41-48, 2002.
37. **Poets CF, Brockmann PE.** Myth: gastroesophageal reflux is a pathological entity in the preterm infant. *Semin Fetal Neonatal Med* 16: 259-263, 2011.
38. **Praud JP.** Upper airway reflexes in response to gastric reflux. *Paediatr Respir Rev* 11: 208-212, 2010.

39. **Qureshi A, Malkar M, Splaingard M, Khuhro A, Jadcherla SR.** The role of sleep in the modulation of gastroesophageal reflux and symptoms in NICU. *Pediatr Neurol* 53: 226-232, 2015.
40. **Ramet J.** Cardiac and respiratory reactivity to gastroesophageal reflux: experimental data in infants. *Biol Neonate* 65: 240-246, 1994.
41. **Ramet J, Praud JP, d'Allest AM, Dehan M, Guilleminault C, Gaultier C.** Cardiac and respiratory responses to esophageal dilatation during REM sleep in human infants. *Biol Neonate* 58: 181-187, 1990.
42. **Rosenbaum T, Simon SA.** TRPV1 receptors and signal transduction. In: *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades – Frontiers in Neuroscience*, edited by Liedtke WB and Heller S. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
43. **Salvatore S, Arrigo S, Luini C, Vandenplas Y.** Esophageal impedance in children: symptom-based results. *J Pediatr* 157: 949- 954, 2010.
44. **Samson N, Michaud A, Nault S, Othman R, Cantin D, Sage M, Nadeau C, Praud JP.** Nasal continuous positive airway pressure increases the efficiency of bottle-feeding in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* : 193: A4750, 2016.
45. **Samson N, Dumont S, Specq ML, Praud JP.** Radio telemetry devices to monitor breathing in non-sedated animals. *Respir Physiol Neurobiol* 179: 111-118, 2011.
46. **Sankaran J, Qureshi AH, Woodley F, Splaingard M, Jadcherla SR.** Effect of severity of esophageal acidification on sleep vs wake periods in infants presenting with brief resolved unexplained events. *J Pediatr* 179:42-48.e1, 2016.
47. **Schey WL, Meus P, Levinsky RA, Campbell C, Replogle R.** Esophageal dysmotility and the sudden infant death syndrome: experimental observations of neonatal puppies. *Radiology* 140: 73-77, 1981a.
48. **Schey WL, Replogle R, Campbell R, Meus P, Levinsky R.** Esophageal dysmotility and the sudden infant death syndrome: clinical experience. *Radiology* 140: 67-71, 1981b.
49. **Slocum C, Hibbs AM, Martin RJ, Orenstein SR.** Infant apnea and gastroesophageal reflux: a critical review and framework for further investigation. *Curr Gastroenterol Rep* 9: 219-224, 2007.
50. **Shaker R, Lang IM.** Reflex mediated airway protective mechanisms against retrograde aspiration. *Am J Med* 103: 64S-73S, 1997.
51. **Shaker R, Ren J, Medda B, Lang I, Cowles V, Jaradeh S.** Identification and characterization of the esophagoglottal closure reflex in a feline model. *Am J Physiol* 266: G147-G153, 1994.

52. **St-Hilaire M, Nsegbe E, Gagnon-Gervais K, Samson N, Moreau-Bussière F, Fortier PH, Praud JP.** Laryngeal chemoreflexes induced by acid, water, and saline in nonsedated newborn lambs during quiet sleep. *J Appl Physiol* 98: 2197-2203, 2005.
53. **St-Hilaire M, Samson N, Nsegbe E, Duvareille C, Moreau-Bussiere F, Micheau P, Lebon J, Praud JP.** Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol* 102: 1429-1438, 2007.
54. **Thach BT.** Maturation and transformation of reflexes that protect the laryngeal airway from liquid aspiration from fetal to adult life. *Am J Med* 111: S69-S77, 2001.
55. **Thach BT.** Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants. *J Appl Physiol* 104: 1828-1834, 2008.
56. **Tuchman DN, Boyle JT, Pack AI, Schwartz J, Kokonos M, Spitzer AR, Cohen S.** Comparison of airway responses following tracheal or esophageal acidification in the cat. *Gastroenterology* 87: 872-881, 1984.
57. **Weusten BL, Akkermans LM, van Berge-Henegouwen GP, Smout AJ.** Symptom perception in gastroesophageal reflux disease is dependent on spatiotemporal reflux characteristics. *A J Gastroenterol* 108: 1739-1744, 1995.
58. **Woodland P, Aktar R, Mthunzi E, Lee C, Peiris M, Preston SL, Blackshaw LA, Sifrim D.** Distinct afferent innervation patterns within the human proximal and distal esophageal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308: G525-G531, 2015.

Article 2. Cardiorespiratory alterations in a newborn ovine model of systemic inflammation induced by lipopolysaccharide injection.

2.1. Avant-propos

Auteurs : Stéphanie Nault, Vincent Creuze, Sally Al-Omar, Annabelle Levasseur, Charlène Nadeau, Nathalie Samson, Roqaya Imane, Sophie Tremblay, Guy Carrault, Patrick Pladys, Jean-Paul Praud

Statut de l'article : Publié.

Journal: *Frontiers in Physiology*, 2020, volume 11 : 585

Contributions : J'ai participé à toutes les étapes menant à la rédaction de cet article, incluant l'élaboration du protocole de recherche, la mise au point du modèle animal, les chirurgies, les enregistrements polysomnographiques, l'analyse des données, la préparation des figures et tableaux et l'écriture du manuscrit sous la supervision de mon directeur de recherche.

2.2. Résumé de l'article 2

Le sepsis néonatal contribue à l'augmentation significative de la mortalité infantile, surtout chez le prématuré, en partie en raison de ses conséquences sur le contrôle cardiorespiratoire. La reconnaissance précoce des signes et symptômes d'un LOS participe à l'amélioration du pronostic néonatal. Par ailleurs, le lien entre le sepsis néonatal et les altérations de l'activité cardiaque et respiratoire reste mal compris et très peu détaillé dans la littérature. L'objectif principal de cette étude était de mettre au point un modèle ovin nouveau-né, physiologiquement proche du nouveau-né humain, d'inflammation systémique *via* l'injection de LPS afin de caractériser ces altérations de façon précoce. Deux polysomnographies de 6 heures ont été réalisées sur deux jours consécutifs chez des agneaux nouveau-nés à terme ($n = 8$). Le premier enregistrement a été effectué après une injection IV de solution saline (= contrôle), et le second après une injection IV de 2,5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de LPS de *E. Coli*. La température rectale, l'activité locomotrice, les stades de conscience, les gaz du sang artériel, la fréquence respiratoire et cardiaque, la pression artérielle systémique moyenne, les apnées, les ralentissements cardiaques et la variabilité cardiaque et respiratoire ont été étudiés en continu. L'objectif secondaire, réalisé chez un second groupe d'agneaux ($n = 8$), était d'évaluer la réflexivité du système nerveux autonome lors d'une inflammation systémique en étudiant les composants cardiorespiratoires des CRL et pulmonaires. Cette évaluation a été effectuée avant l'injection de LPS ($T = 0$) et à 30 minutes, 2 heures et 24 heures post LPS. Globalement, les résultats de l'objectif principal ont montré une diminution de la mobilité et de l'éveil agité et une augmentation biphasique de la température rectale, de la FC et de la FR en plus d'une augmentation des ralentissements cardiaques. Une diminution globale de la VFC et de la VFR a également été observée. Quant à l'objectif secondaire, aucune modification n'a été observée. Enfin, des résultats préliminaires de l'inflammation (augmentation d'IL-8 et TNF- α et activation de cellules microgliales) fournissent une preuve de concept que l'inflammation du tronc cérébral peut être montrée 6 heures post injection de LPS. Ainsi, l'injection de LPS mime plusieurs aspects d'un sepsis bactérien chez les agneaux nouveau-nés avec de multiples conséquences, y compris des altérations cardiorespiratoires.

2.3. Article 2

Cardiorespiratory alterations in a newborn ovine model of systemic inflammation induced by lipopolysaccharide injection

Stéphanie Nault,¹ Vincent Creuze,² Sally Al-Omar,¹ Annabelle Levasseur,¹ Charlène Nadeau,¹ Nathalie Samson,¹ Roqaya Imane,³ Sophie Tremblay,³ Guy Carrault,⁴ Patrick Pladys,⁴ and Jean-Paul Praud^{1*}

¹Neonatal Respiratory Research Unit, Departments of Pediatrics and Pharmacology-Physiology, Université de Sherbrooke, QC, Canada

²Department of LIRMM, Université de Montpellier, CNRS, France

³Departments of Neurosciences and Pediatrics, CHU Sainte-Justine Research Center, Faculty of Medicine, Université de Montréal, QC, Canada

⁴ Inserm, LTSI – UMR 1099, F-35000, University Rennes 1, CHU Rennes, Rennes, France.

*** Correspondence:**

Jean-Paul Praud MD PhD
Departments Pediatrics /Physiology
QC, Canada, J1H 5N4

Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca
Université de Sherbrooke
Phone: (819) 346-1110, ext 73147

Keywords: Lipopolysaccharides, neonatal sepsis, cardiorespiratory control, heart-rate variability, respiratory-rate variability.

Running title: Cardiorespiratory activity during systemic inflammation

Funding: Patrick Pladys received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement no. 689260 (Digi-NewB project). Sophie Tremblay received funding from the Scottish Rite Charitable Foundation of Canada and the Canadian Institutes of Health Research. Jean-Paul Praud received funding from the Canada Research Chair in Neonatal Respiratory Physiology and is a member of the University of Sherbrooke Hospital Research Center.

ABSTRACT

Although it is well known that neonatal sepsis can induce important alterations in cardiorespiratory control, their detailed early features and the mechanisms involved remain poorly understood. As a first step in resolving this issue, the main goal of this study was to characterize these alterations more extensively by setting up a full-term newborn lamb model of systemic inflammation using lipopolysaccharide (LPS) injection. Two 6-hour polysomnographic recordings were performed on two consecutive days on eight full-term lambs: the first after an IV saline injection (control condition); the second, after an IV injection of 2.5 $\mu\text{g/kg}$ *Escherichia coli* LPS 0127:B8 (LPS condition). Rectal temperature, locomotor activity, state of alertness, arterial blood gases, respiratory frequency and heart rate, mean arterial blood pressure, apneas and cardiac decelerations, and heart-rate and respiratory-rate variability (HRV and RRV) were assessed. LPS injection decreased locomotor activity ($p = 0.03$) and active wakefulness ($p = 0.01$) compared to the control condition. In addition, LPS injection led to a biphasic increase in rectal temperature ($p = 0.01$ at ~ 30 and 180 minutes) and in respiratory frequency and heart rate ($p = 0.0005$ and 0.005 , respectively), and to an increase in cardiac decelerations ($p = 0.05$). An overall decrease in HRV and RRV was also observed. Interestingly, the novel analysis of the representations of the horizontal and vertical visibility network yielded the most statistically significant alterations in HRV structure, suggesting its potential clinical importance for providing an earlier diagnosis of neonatal bacterial sepsis. A second goal was to assess whether the reflexivity of the autonomic nervous system was altered after LPS injection by studying the cardiorespiratory components of the laryngeal and pulmonary chemoreflexes. No difference was found. Lastly, preliminary results provide proof of principle that brainstem inflammation (increased IL-8 and TNF- α mRNA expression) can be shown 6 hours after LPS injection. In conclusion, this full-term lamb model of systemic inflammation reproduces several important aspects of neonatal bacterial sepsis and paves the way for studies in preterm lambs aiming to assess both the effect of prematurity and the central neural mechanisms of cardiorespiratory control alterations observed during neonatal sepsis.

INTRODUCTION

Sepsis is defined as a systemic inflammation caused by a bacterial, viral, or fungal infection (Hotchkiss et al, 2016; Singer et al., 2016). Neonatal sepsis remains a major problem, especially in preterm infants with late-onset sepsis (LOS), in whom it causes substantial morbidity and mortality (Mayr et al., 2014; Shane et al., 2017). Early diagnosis of sepsis is challenging because the initial clinical signs are nonspecific (Fanaroff et al., 1998). While recurrent apnea/bradycardias are frequently observed during LOS, more subtle alterations in heart rate (HR) and respiratory-rate variability (RRV) are often the first and sole manifestations detectable in the early phase of sepsis (Beuchée et al., 2009). The currently available monitoring of heart-rate variability (HRV) allows earlier diagnosis of LOS (Griffin et al., 2005; Bohanon et al., 2015), with a reported decrease in death rate of 20% (Fairchild, 2013). This approach is, however, hampered by low specificity, which limits its clinical usefulness. The use of HRV analysis methods with better diagnostic accuracy are needed to further improve the early LOS detection and prognosis (Coggins et al., 2016). Moreover, a better understanding of the altered cardiorespiratory control during neonatal sepsis is needed.

Two studies in rodents by a Swedish team concluded that the inflammatory response to systemic injection of lipopolysaccharides (LPS), taken as a model of bacterial sepsis, inhibits respiration (Olsson et al., 2003; Hofstetter et al., 2007). This team then found a correlation between the number of apneas and infected newborns (Siljehav et al., 2015). These results were, however, restricted to the alterations in respiratory frequency (f_R) and apnea events; no information was provided on the altered HR and bradycardias. While a few other studies of neonatal sepsis in animal models—including lambs (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005; Hamilton et al., 2006; Feng et al., 2010), rodents (Olsson et al., 2003; McDonald et al., 2016a,b), and piglets (McDeigan et al., 2003)—revealed certain cardiorespiratory alterations, the duration of all these studies was limited to a few minutes and/or the time course of these alterations were not detailed. Overall, to our knowledge, available results have not fully characterized the cardiorespiratory-control alterations present in newborns

in the early phase of sepsis. As a first step in our research program, the main goal of the present study was to set up a full-term newborn lamb model of systemic inflammation using LPS injection to characterize those alterations more extensively using continuous recordings of cardiac and respiratory activity. A second goal was to assess whether the reflexivity of the autonomic nervous system was altered after LPS injection by studying the cardiorespiratory components of the laryngeal and pulmonary chemoreflexes. Lastly, we aimed at providing preliminary results in a few additional lambs as proof of principle that brainstem inflammation may be involved in the alterations in cardiorespiratory control observed in our neonatal ovine model.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care. The study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke (protocol #409-16). A total of 20 full-term, mixed-bred male lambs, aged 2–4 days, were included in the study.

Chronic instrumentation and recording equipment

Chronic surgical instrumentation was performed under local anesthesia with 2% lidocaine and conscious sedation with ketamine 5 mg/kg, preceded by anafen 3 mg/kg + atropine sulfate 0.1 mg/kg. Surgical instrumentation consisted in the insertion of a catheter into the left carotid artery for monitoring systemic arterial blood pressure and for sampling arterial blood gases. General anesthesia was not used in order to avoid its effects on heart-rate and respiratory-rate variability (Venet et al., 2018). Antibiotics (ampicillin 50 mg and tobramycin 5 mg/kg) were also injected intramuscularly before anesthesia and once a day throughout the study.

The instrumentation was completed after a postoperative recovery period of 24 hours, immediately before the experiments with: (i) subcutaneous needle electrodes for electroencephalogram (EEG), electrooculogram (EOG), and electrocardiogram (ECG) recordings; (ii) elastic bands on the chest and abdomen to record lung-volume variations semiquantitatively via respiratory inductance plethysmography; (iii) a pulse-oximeter probe placed at the base of the tail for oxygen hemoglobin saturation (SpO₂); and (iv) a rectal probe to record body core temperature. Physiological signals were transmitted wirelessly using our custom-designed radiotelemetry system (Samson et al., 2011) and continuously recorded on a PC using the AcqKnowledge software (version 4.1, Biopac Systems, Montreal, Canada).

Design of the study

All lambs were housed in a Plexiglas chamber [1.2 m long × 1.2 m wide × 1 m high with a floor surface of 1.44 m² in accordance with the Canadian Council on Animal Care standards for housing one or two newborn lambs at the same time. They were able to move about and feed *ad libitum* from a custom-built lamb feeder (Duvareille et al., 2010). As previously described (Porée et al., 2014), an infrared video camera was positioned above the Plexiglas chamber to continuously monitor locomotor activity throughout the experiment.

Main objective of the study

Neonatal ovine model of systemic inflammation induced by lipopolysaccharide injection

Systemic inflammation was induced in eight full-term lambs weighing 3.3 ± 0.7 kg (range: 2.3–4.2 kg) by an intravenous injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharides (LPS, 0127: B8, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), a classical Toll-like receptor 4 (TLR4) agonist mostly involved in gram-negative bacterial infections.

After a postoperative recovery period of 24 hours, two 6-hour polysomnographic recordings were taken on nonsedated lambs on two consecutive mornings. During the first experimental day, each lamb received an intravenous bolus of 10 mL of normal saline solution (control condition, CTRL), whereas 10 mL of LPS from *E. coli* (2.5 µg/kg) were administered on the second day (LPS condition). An experimenter was present throughout the recording sessions. Arterial blood gases (pH, PaCO₂, PaO₂, and HCO₃⁻) were measured at baseline and at time 3 hours and 6 hours. Once the recordings had been completed, the subjects were euthanized with an IV injection of 90 mg/kg of pentobarbital sodium.

Video analysis of locomotor activity

The activity index, the total distance traveled, and the percentage of time the animal was active throughout the recordings were calculated with a custom software. The infrared video camera located above the Plexiglas chamber gave black-and-white top views of the scene with a resolution of 320x240 pixels at 30 fps. The software we developed to process the videos and extract the lamb's trajectory is adapted to any static (or very slow varying)

environment. Initialization of the image-processing algorithm was performed on the first frame of the video file by selecting the 100 best feature points with a standard Harris corner detector (Shi and Tomasi, 1994) (See details in Figure 1 of the supplemental material). Thereafter, the feature points were tracked on the successive images with a Kanade-Lucas-Tomasi tracker (Tomasi and Kanade, 1991). At every iteration, the movement of each feature point above a threshold was computed to determine whether each point had moved between the two successive images. If the number of moving points was smaller than eight, the movement was considered as noise, e.g., limb motions while the lamb was lying. Conversely, a number of moving points greater than eight was taken as displacement of the lamb. Lastly, the lamb's position in the image was computed by calculating the barycenter of the moving points and using the camera parameters (prior calibrations) and cage dimensions. The algorithm was coded in C++ with OpenCV library and used under a Windows 7 environment on an Intel® Core™ i7-5600U 2.6GHz CPU.

States of alertness

Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define quiet and active wakefulness, as well as non-rapid eye movement (NREM) and rapid eye movement (REM) sleep (Renolleau et al., 1999).

Cardiac and respiratory function

Respiratory movements, ECG, and arterial blood pressure were continuously recorded for a period of 6 hours during both control and LPS conditions. The following variables were calculated every 15 min: (i) respiratory frequency (f_R), heart rate (HR), and mean systemic arterial pressure (MAP) averaged on 30 seconds; (ii) the number of apneas (defined as at least two missed breaths) and the total apnea duration during the whole six-hour recording; (iii) the number of cardiac decelerations (defined as a decrease in HR greater than 30% lasting less than 5 seconds); and (iv) the number of bradycardias (defined as cardiac decelerations lasting at least 5 seconds).

Heart-rate and respiratory-rate variability

Our semiautomated processing approach, previously developed using Matlab R2013a software (The MathWorks Inc., Natick, Mass., USA), was applied on the ECG and respiratory signals (Al-Omar et al., 2018). Each 6-hour recording was automatically processed to extract all the 2-minute stationary periods, which were considered to reflect the changes in autonomic state, according to previously proposed criteria (Borgnat et al., 2010). QRS complexes were then automatically detected as the maximum above a manually fixed threshold. The quality of each RR (cardiac-cycle length) series obtained was checked manually and corrected when necessary.

Heart-rate variability. HRV reflects the heart's adaptation to internal and external stimuli and is measured by the variation in RR intervals from the ECG signal. Analysis methods of RR interval time series were chosen considering past results on neonatal sepsis (Nguyen et al., 2017). Time-domain analysis of HRV included the mean and standard deviation (SD) of RR duration, an index of global HRV, and the square root of the mean squared differences of successive RR intervals (rMSSD), mainly reflecting parasympathetic control. The complexity and regularity of the RR series were assessed by computing the sample entropy (SampEn). The RR series, resampled at 4 Hz, were also subjected to frequency-domain analysis, through autoregressive estimation of the power spectrum and integration of the low-frequency (LF, 0.02–0.25 Hz, modulated by the arterial baroreflex) and high-frequency (HF, 0.25–2 Hz, from respiratory origin) spectral bands (Beuchée et al., 2007). The LF/HF ratio was calculated as an index of sympathovagal balance. In addition, the following nonlinear analyses were performed. The Poincaré plot further assessed short-term (SD1) and long-term (SD2) HRV. Acceleration capacity (AC) and deceleration capacity (DC) were computed as previously described (Nguyen et al., 2017). The scale invariance (self-similarity of RR time series) was tested through the detrended fluctuation analysis technique, using the fractal scaling exponent α_1 (from 4 to 40 beats) (Al-Omar et al., 2019).

In addition, the search for new methods with better accuracy to further improve the early detection of LOS led us to use HRV analyses based on the representations of the horizontal

and vertical visibility networks (Lacasa et al., 2008; Madl, 2016; Nguyen Phuc Thu et al., 2019). Analysis of the horizontal and vertical visibility graphs allow for simultaneously assessing periodicity, fractality, and discontinuity properties of RR time series, hence providing novel global insight into HRV. The resulting dimensionless network representations (see Supplementary figure 2-5, paragraph entitled “A simple introduction to horizontal and vertical visibility graphs” for a simplified, step-by-step explanation) are based on the organization of connectivity between the different durations of successive cardiac cycles. The networks derived from the visibility analyses have several interesting properties, such as differentiating stochastic, chaotic, and deterministic dynamical systems. Alterations in network graphic representations can be visually recognized and quantified by computing several variables, including the mean degree, assortativity, and transitivity (Luque et al., 2009).

Respiratory-rate variability. Respiratory-rate variability ensures respiratory-system stability. It results from the central respiratory drive issued from the brainstem respiratory centers, whose activity is modulated by multiple internal factors of nervous and chemical origin; some random variability reflects system sensitivity to external stimuli. Linear analyses of RRV in the time domain were performed, as previously described, on Ttot (total breathing cycle duration) series (Al-Omar et al., 2018) and included mean and SD computation. Nonlinear analyses of Ttot variability included Poincaré plots (SD1 and SD2) and sample entropy (SampEn).

Cardiorespiratory interrelations. The Pearson r^2 and the nonlinear h_2 correlation coefficients, the mean phase coherence $\gamma_{RR,RESP}$, and the amplitude of the respiratory sinus arrhythmia (RSA, the difference between the maximum, and the minimum RR in a respiratory cycle) (Carroll et al., 2012) were calculated, as previously detailed (Al-Omar et al., 2018).

Secondary objective of the study

Impact of LPS injection on the reflexivity of the autonomic nervous system

The laryngeal and pulmonary chemoreflexes were studied in a second group of eight full-term lambs weighing 4.1 ± 0.7 kg (range: 2.9–5.0 kg), 24 hours after the surgical instrumentation described above. In addition, for the laryngeal chemoreflexes, a transcutaneous supraglottal catheter was inserted into the laryngeal vestibule, as previously described (Boudaa et al., 2013). Briefly, a 16-gauge infusion catheter was securely positioned such that its tip protruded 5-7.5 mm above the anterior part of the glottis. A plastic tube (internal diameter 1 mm) was subcutaneously tunneled in the neck of the animal and connected to the external part of the supraglottal catheter, which protruded 15-20 mm externally at the level of the anterosuperior aspect of the thyroid cartilage. The stimulations were performed once before LPS-injection and repeated 30 minutes, 2 hours and 24 hours after LPS injection. The laryngeal chemoreflexes were induced with an injection of 0.5 mL HCl (pH 2) into the larynx during non-REM sleep. The pulmonary chemoreflexes were induced with an intravenous injection of 1 mL of capsaicin (10 μ g/kg) into the jugular vein (Diaz et al., 1999). The occurrence of apneas, cardiac decelerations, and O₂ hemoglobin desaturations was analyzed as described previously (Diaz et al., 1999; Boudaa et al. 2013).

Data analysis

Data collection was performed over 10 seconds immediately before each stimulation (baseline) and continued over the next 60-second period. The following inhibitory cardiorespiratory responses to each stimulation were computed: (1) the percent decrease in HR; (2) the number of cardiac decelerations (defined as a decrease in HR of at least 30% for <5 seconds); (3) the number of bradycardias (defined as cardiac deceleration lasting at least 5 seconds); (4) the total duration of cardiac inhibition (including cardiac decelerations and bradycardias); (5) the number and total duration of apneas (defined as at least two missed breaths), and (6) the percent decrease in O₂ hemoglobin saturation.

Preliminary studies on brainstem inflammation

Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR.

Preliminary studies on brainstem inflammation were performed on four of the lambs from the main objective, six hours after LPS injection, and on four additional control lambs, six hours after saline injection. Following euthanasia, four control brains and four LPS brains were infused with cold PBS (1X). The brainstem was removed *en bloc* and kept in a TRIzol solution at – 80 °C. Total RNA extraction was performed using the RNeasy Midi Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was measured with a Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and RNA quality was measured with an Agilent 4200 Tapestation (Agilent, Mississauga, ON, Canada) to obtain the RNA integrity number. An amount of 1 µg of total RNA was reverse transcribed with the QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR amplification was carried out for 40 cycles with the QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, 1.5 µL of cDNA template were added to the master mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, ThermoFisher Scientific) with the appropriate primers. The amplification of IL-8 and TNF-α cDNA was carried out in triplicate on a 96-well plate in a final volume of 10 µL, including a negative water control for each primer. The qPCR conditions were as follows: 50 °C for 2 minutes, 95 °C for 10 minutes followed by 40 cycles of 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 1 minute. The cycle threshold values were automatically calculated using the manufacturer's software. The delta-cycle threshold values were determined using the comparative CT method, as described previously (Schmittgen et Livak, 2008), and the relative quantification was normalized with the 2-ΔCT formula with the SDHA housekeeping gene as an endogenous control. The PCR probes and primers used are reported in Table 1 in the supplemental material.

Tissue collection and immunofluorescent staining. Brainstems were dissected from the whole brains under saline perfusion, then fixed in 10% formalin solution, washed in PBS, and immersed in 30% sucrose solution at 4°C until they sank. The fixed brainstems were

embedded in OCT (optimum cutting temperature) compound and frozen at -80°C . Sagittal sections $16\text{ }\mu\text{m}$ thick spaced at $160\text{ }\mu\text{m}$ were performed serially from the medial to the lateral brainstem using a Cryostat Thermo CryoStar NX50 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and mounted on glass slides until use. Sections were warmed up at room temperature and equilibrated with PBS 1X, followed by an incubation period with a blocking solution containing 10% normal goat serum, 0.3% BSA, and 0.4% TritonX-100 for 30 minutes at room temperature. Subsequently, sections were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with these primary antibodies: rabbit polyclonal anti-Iba1 (1/400) (Wako, Richmond, VA, USA) and mouse monoclonal anti-GFAP (1/200) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Brainstem sections were then washed 3 times with PBS 1X for 5 minutes and incubated with these secondary antibodies: goat anti-rabbit IgG AlexaFluor 488 (1:200) and goat anti-mouse IgG AlexaFluor 594 (1:500) (Life Technologies, Waltham, MA, USA) for 1 hour at room temperature. After several washings, the slides were coverslipped with FluorSave™ reagent (EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

Analysis of microglial cell morphology. Microglial cells serve as resident macrophages in the nervous system and can be activated, e.g. by LPS, to produce various inflammatory mediators, such as IL-8 and TNF- α (Ehrlich et al., 1998; Welser-Alves and Milner, 2013). Upon activation, quiescent ramified microglia proliferate and transform into reactive microglia. For this proof-of-concept study, we compared the results from a total of six images (three sections \times two images per section) obtained in one LPS-injected and one control lamb. Iba1-positive cells (microglia) of the rostral ventrolateral medulla were imaged using a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica, Deerfield, IL, USA) with a 63X objective generating 12.5 to $17.5\text{ }\mu\text{m}$ thick Z-stacks with a step size of $0.5\text{ }\mu\text{m}$, a $1024 \times 1024\text{ }\mu\text{m}$ image size, and a X-Y scale of $0.18\text{ }\mu\text{m}$. The images were preprocessed to subtract background and remove speckles with ImageJ. Following qualitative assessment of the number and morphology of microglial cells, a quantitative 3D-morphological analysis of microglial cells using the 3DMorph Automatic Analysis Software, a MATLAB-based script (MathWorks, Natick, MA, USA) was performed. Output data of this analysis included individual cell volume, total territorial volume, and branch length (York et al., 2018).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with help from our research center's biostatistics department. Values were expressed as median (Q1, Q3). Statistical analyses were performed on raw data for all dependent variables. The Wilcoxon signed rank test was used to assess the effect of LPS injection on body core temperature, locomotor activity, states of alertness, apnea number, total apnea duration, cardiac deceleration, bradycardia number, and total cardiac deceleration duration. A similar analysis was also performed on the dependent variables computed for HRV, RRV and cardiorespiratory interrelations. To assess the effect of LPS on laryngeal and pulmonary chemoreflexes, a Friedman's test was performed, followed by a post hoc Wilcoxon signed-rank test, when appropriate. All analyses were performed with SPSS Statistics for Windows (version 25, Armonk, NY, USA).

In addition, mixed models were used to evaluate the association between independent variables (recording-time point, temperature, and LPS injection) and each outcome variable (respiratory frequency, heart rate, and mean arterial pressure). Since multiple measurements were made in each lamb, a random effect on intercept and a first-order autoregressive structure of the residuals were specified in the covariance structure of the mixed models. Linear, quadratic, and cubic associations were studied for time and temperature, considering each day separately, and included in the multivariable models if significant. Models were obtained from PROC MIXED in SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Main objective of the study

Body core temperature

Contrarily to control condition, LPS injection induced a biphasic increase in body core temperature in 7/8 lambs with a first peak at approximately 30 min ($\Delta T = 1.3^{\circ}\text{C}$; $p = 0.01$) followed by a second, longer increase peaking around 3 h ($\Delta T = 1.3^{\circ}\text{C}$; $p = 0.01$). Thereafter, body core temperature gradually decreased back to baseline level 5.5 hours after LPS injection. Of note, one lamb out of eight presented marked hypothermia (max. $\Delta T -3^{\circ}\text{C}$ around the 3-hour time point) after the first temperature peak at 30 min (Figure 1). In addition to the changes in body temperature, all lambs were less active and presented diarrhea.

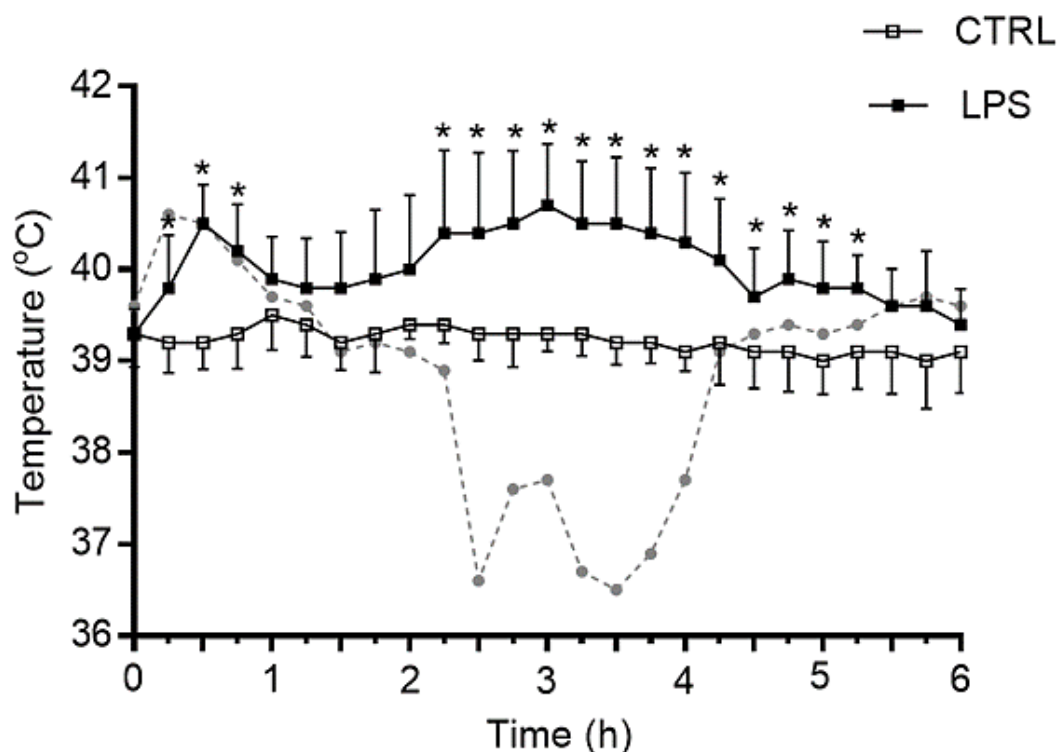


Figure 1. Variation of body core temperature after intravenous injection of lipopolysaccharide. LPS induced a biphasic increase in body core temperature in 7/8 newborn lambs. ▲: peaks of temperature. The dotted curve in gray represents the sole lamb who developed marked hypothermia following an initial increase in temperature. Results are illustrated as mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs. control condition (CTRL).

Locomotor activity

Video analysis ($n = 7$) revealed that LPS injection decreased the total distance traveled [38.7 (35.4, 54) vs. 93.8 (73, 128.1) m, $p = 0.03$] (Figure 2A and 2D) and the percentage of time the animal was active [0.9% (0.8, 1.2) vs. 2.2% (1.8, 2.8), $p = 0.03$] (Figure 2B) compared to the control condition. Moreover, LPS injection significantly decreased the distance traveled per hour of recording at the 2-hour [3.2 (0.4, 6) vs. 12.4 (4.5, 28.3) m, $p = 0.04$], 3-hour [0 (0, 0.8) vs. 20.4 (15.6, 35.5) m, $p = 0.02$], and 4-hour time points [0.7 (0.4, 1.5) vs. 12.5 (10.4, 16.6) m, $p = 0.02$] (Figure 2C).

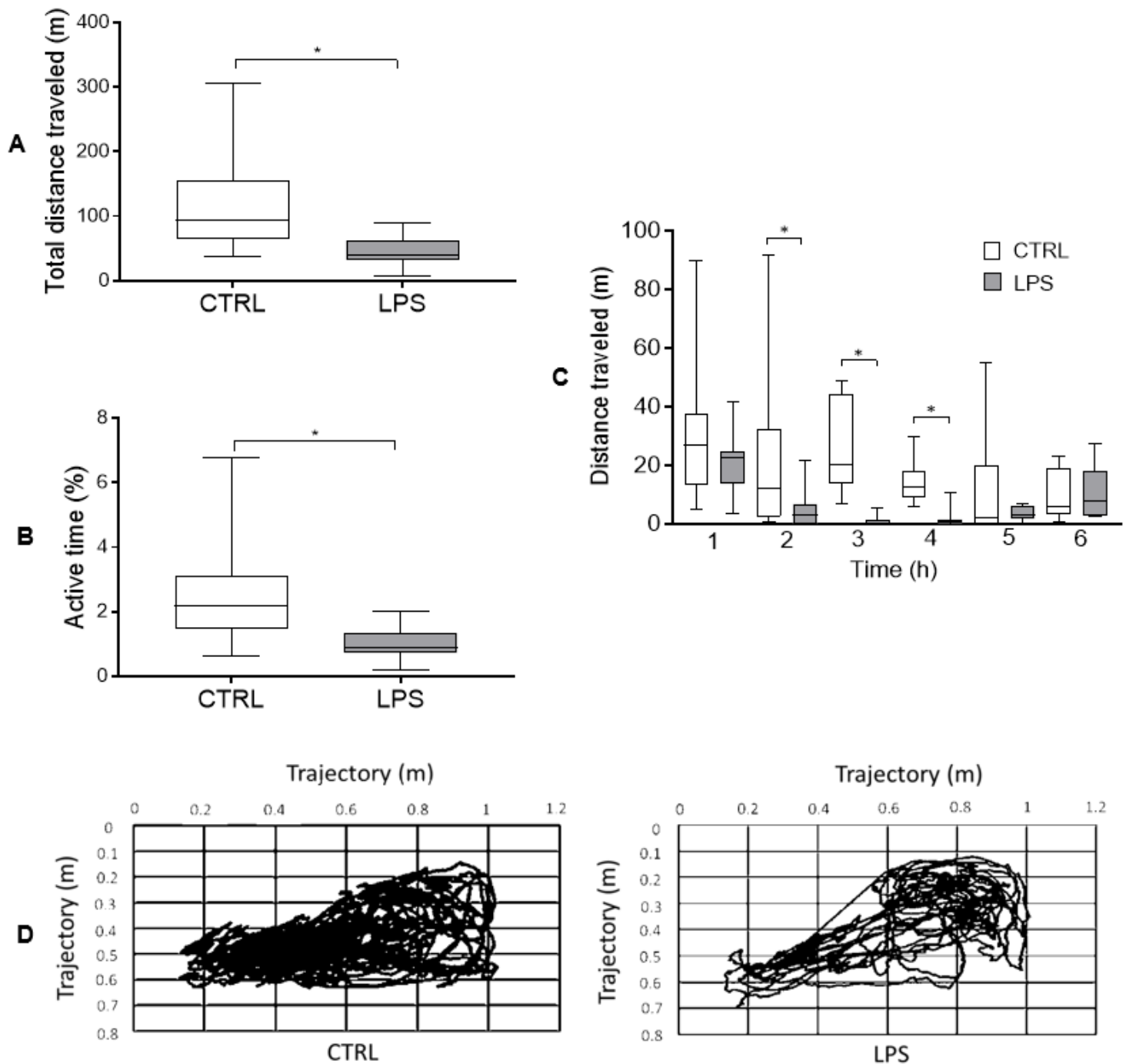


Figure 2. Video analysis of locomotor activity during the 6-hour recordings. The total distance traveled (**A**) and the percentage of time the animal was active (**B**) were significantly decreased during the LPS and control conditions. In addition, the distance traveled per hour of recording (**C**) was significantly lower at 2, 3, and 4 hours after LPS injection. Example of trajectory plots in the control and LPS conditions in one lamb (**D**). Results are illustrated as median (Q1, Q3), * $p < 0.05$ vs. control condition (CTRL).

States of alertness

LPS injection significantly increased the percentage of recording time spent in quiet wakefulness [51% (47, 53) vs. 42% (37, 47), $p = 0.03$] and significantly decreased the percentage of time spent in active wakefulness [21% (17, 23) vs. 11% (7, 15), $p = 0.01$] compared to control condition. No statistical differences were noted for NREM [28% (19, 31) vs. 21% (15, 25)] and REM sleep [5% (4, 6) vs. 5% (4, 9)] between the LPS and control conditions, respectively.

Arterial blood gases

HCO_3^- was significantly decreased at the 3-hour [23 (22, 24) vs. 26 (25, 30) mmol/L, $p = 0.03$] and 6-hour time points [25 (22, 26) vs. 30 (29, 31) mmol/L, $p = 0.04$] in the LPS compared to the control condition, respectively. Similarly, PaCO_2 was decreased at the 6-hour time point [37 (30, 38) vs. 39 (36, 42) mmHg, $p = 0.03$] compared to the control condition. No statistical differences were observed for pH and PaO_2 between the two conditions (Table 1).

Table 1. Arterial blood gases for each condition

	T = 0	T = 3	T = 6	T = 0	T = 3	T = 6
	Control n = 8			LPS n = 8		
PaO ₂ (mmHg)	79 (73, 93.3)	85 (59, 105)	93 (72, 96)	89 (80, 96)	110 (98, 126)	95 (92, 111)
PaCO ₂ (mmHg)	40 (37, 43)	36 (31, 42)	39 (36, 42)	39 (37, 41)	34 (31, 35)	37 (30, 38)*
pH	7.44 (7.43, 7.48)	7.49 (7.48, 7.5)	7.5 (7.5, 7.5)	7.45 (7.43, 7.47)	7.42 (7.41, 7.44)	7.46 (7.44, 7.48)
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	27 (26, 28)	26 (25, 30)	30 (29, 31)	27 (25, 29)	23 (22, 24)*	25 (22, 26)*

Results are expressed as median (Q1, Q3) at time 0 (T = 0), 3 hours (T = 3) and 6 hours (T = 6) after LPS injection. PaCO₂ (partial pressure of carbon dioxide in arterial blood); PaO₂ (partial pressure of oxygen in arterial blood); HCO₃⁻; bicarbonate concentration in arterial blood. **p* < 0.05: vs. control condition.

Effect of LPS injection on cardiorespiratory control

Respiratory activity. Overall, LPS injection significantly increased f_R compared to the control condition [61 (59, 63) vs. 49 (47, 52) $\cdot \text{min}^{-1}$, $p = 0.0005$]. More precisely, f_R increased rapidly during the first 36 (30–40) min, then decreased until 60 min and rose again thereafter (Figure 3A). While the biphasic time course of f_R variations grossly reproduced that of temperature, no significant relationship was found between f_R and temperature. In addition, LPS injection significantly decreased total apnea duration compared to the control condition [35.7 (18.2, 61.6) vs. 88.5 (42.7, 133.7) seconds, $p = 0.04$], while the number of apneas did not significantly decrease [8 (5.3, 12.3) vs. 16 (9.3, 21.8), $p = 0.1$] (Figure 4A).

The increase in f_R was confirmed when measured in the 2-minute stationary periods for all lambs except one. Overall, the increase in the LPS condition exceeded 2 SD of the f_R observed in the control condition after 30 to 40 min and was associated with a significant decrease in T_i/T_{tot} . The increase in f_R was associated with a significant decrease in RRV (SD of T_{tot}), which involved both short- and long-term variability, as measured by SD1 of T_{tot} and SD2 of T_{tot} of the Poincaré plot (Table 2).

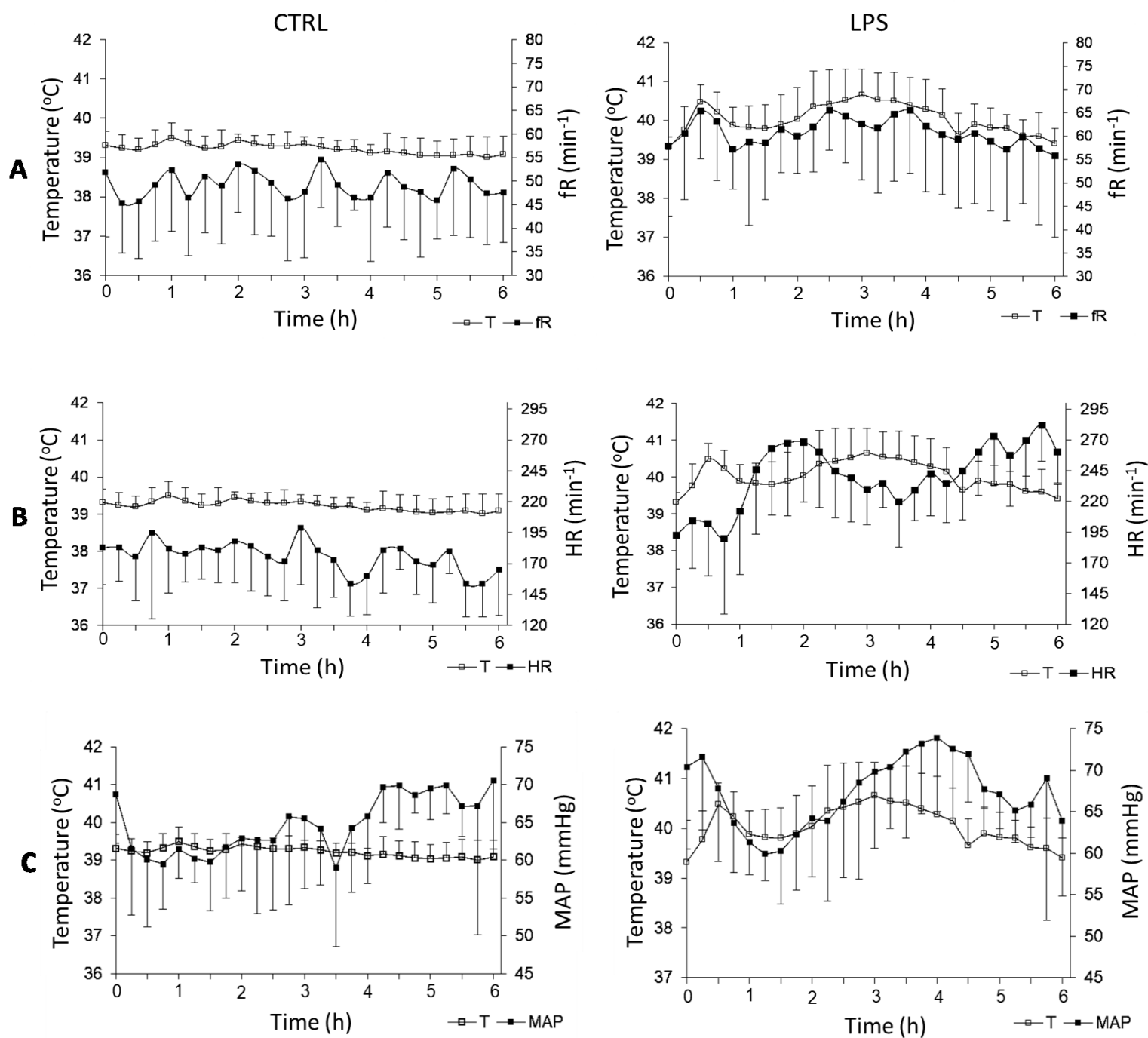


Figure 3. Effects of lipopolysaccharide injection on heart rate and respiratory frequency. LPS injection significantly increased respiratory frequency (**A**) and heart rate (**B**) compared to control condition. No significant alteration was observed for mean systemic arterial pressure (**C**). Left panel: control condition (CTRL); right panel: LPS condition. f_R (respiratory frequency); T (temperature); HR (heart rate); and MAP (mean arterial pressure). Results are illustrated as mean ± SD.

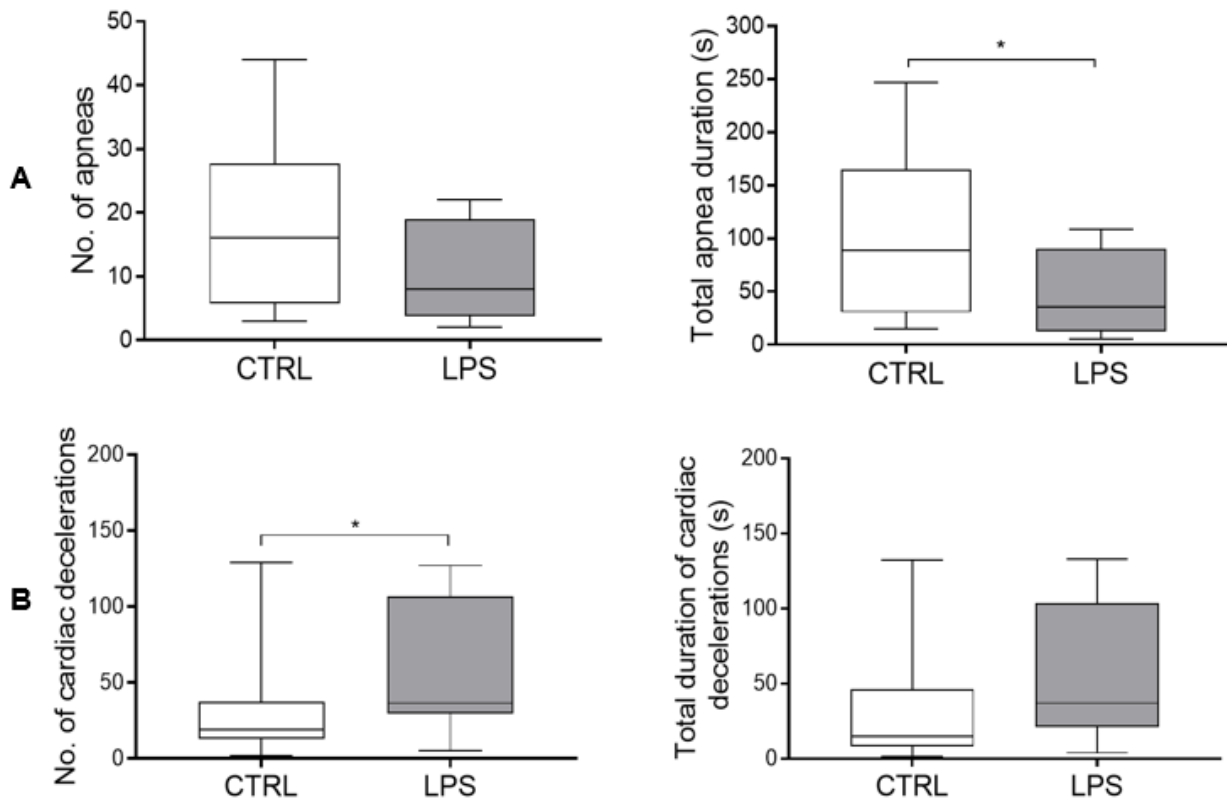


Figure 4. Effects of lipopolysaccharide injection on apnea and cardiac decelerations. (A) LPS injection significantly decreased total apnea duration compared to the control condition, but did not change the number of apneas. (B) LPS injection increased the number of cardiac decelerations, while no difference was observed for the total duration of cardiac decelerations. No, number. Results are illustrated as median (Q1, Q3), * $p < 0.05$ vs. control condition (CTRL).

Table 2. Heart-rate and respiratory-rate variability observed in stationary condition

N = 8	Control	LPS at max1	p value
RR (ms)	342 (307, 371)	237 (219, 258)	$< 10^{-6}^*$
Ttot (ms)	1220 (1066, 1340)	921 (818, 984)	$< 10^{-6}^*$
Ti (ms)	546 (480, 608)	386 (353, 409)	$< 10^{-6}^{**}$
Te (ms)	647 (538, 732)	522 (469, 587)	$< 10^{-6}^*$
Ti/Ttot	0.46 (0.43, 0.47)	0.43 (0.41, 0.44)	$< 10^{-3}$
HRV			
SD (ms)	9 (7, 13)	7 (4, 11)	NS
rMSSD (ms)	3 (1, 7)	2 (1, 5)	NS
SD1 (ms)	4 (2, 6)	3 (1, 5)	$< 10^{-4}$
SD2 (ms)	13 (9, 17)	9 (5, 15)	$< 10^{-2}$
HF ($10^3 \cdot \text{ms}^2$)	6.8 (2.8, 17.2)	3.3 (1, 11.3)	0.07
LF ($10^3 \cdot \text{ms}^2$)	26.1 (12.9, 45.2)	7.2 (3, 30.5)	< 0.05
LF/HF	3.3 (1.8, 6.4)	2.6 (1.8, 4.3)	0.05
SampEn	0.19 (0.07, 0.39)	0.39 (0.13, 0.82)	NS
AC	0.30 (0.04, 0.69)	0.07 (-0.02, 0.25)	$< 10^{-4}$
DC	0.54 (0.22, 0.03)	0.14 (0.05, 0.38)	$< 10^{-4}$
$\alpha 1$	1.15 (1.01, 1.26)	1.15 (1.05, 1.28)	NS
V-MD	6.61 (5.46, 8.06)	5.37 (4.51, 6.88)	$< 10^{-3}$
V-assortativity	0.08 (-0.01, 0.13)	0.01 (-0.03, 0.06)	$< 10^{-4}$
V-transitivity	0.44 (0.41, 0.46)	0.42 (0.40, 0.44)	$< 10^{-3}$
H-MD	2.84 (2.40, 3.17)	2.81 (2.04, 3.10)	NS
H-assortativity	0.09 (0.04, 0.18)	0.04 (0, 0.09)	$< 10^{-6}$
H-transitivity	0.39 (0.38, 0.41)	0.36 (0.35, 0.37)	$< 10^{-6}^{**}$
RRV			
SD Ttot (ms)	105 (87, 144)	60 (49, 83)	$< 10^{-6}$
SD1 Ttot (ms)	83 (60, 114)	49 (39, 72)	$< 10^{-5}^*$
SD2 Ttot (ms)	125 (94, 178)	66 (53, 92)	$< 10^{-6}$
SampEn Ttot	2.3 (2.14, 2.72)	2.38 (2.17, 2.60)	NS
Cardiorespiratory interrelations			
r^2	0.02 (0.01, 0.05)	0.02 (0.01, 0.05)	NS
h^2	0.08 (0.05, 0.11)	0.08 (0.05, 0.25)	NS
$\gamma_{RR,RESP}$ (n.u.)	0.08 (0.04, 0.11)	0.01 (0.01, 0.05)	$< 10^{-5}$
RSA (ms)	7.1 (4.6, 12.5)	5.8 (3.4, 9.2)	< 0.05

Results are expressed as median (Q1, Q3). LPS at max1, variability computed at the time of the first peak in frequency after LPS injection. RR, cardiac-cycle length; Ttot, respiratory-cycle duration; Ti, inspiratory time; Te, expiratory time; SD, standard deviation; rMSSD, square root of the mean squared differences of successive RR intervals; SD1, Poincaré plot short-term variability coefficient; SD2, Poincaré plot long-term variability coefficient; HF, high frequency; LF, low frequency; SampEn, sample entropy; AC and DC, acceleration and deceleration capacities; α_1 , α_1 fractal coefficient (detrended fluctuation analysis); r^2 , Pearson's r^2 correlation coefficient; h^2 , nonlinear h^2 correlation coefficient; $\gamma_{RR,RESP}$, synchronization index; RSA, amplitude of respiratory sinus arrhythmia. The new variables used to describe vertical (V) and horizontal (H) visibility are the clustering coefficient [V-MD (vertical mean degree) and H-MD (horizontal mean degree)], the assortativity (V-assortativity and H-assortativity), and the transitivity (V-transitivity and H-transitivity). * $p < 0.05$ for all lambs except one; ** $p < 0.05$ for all lambs.

Cardiac activity. Overall, LPS injection significantly increased HR compared to the control condition [245 (229, 261) vs. 180 (172, 183) $\cdot \text{min}^{-1}$, $p = 0.005$] (Figure 3B). Of note, conversely to f_R , the time course of HR variations did not follow that of temperature. Indeed, although the increase in HR was also biphasic, the two phases were clearly delayed compared to f_R and temperature, the overall shape of the HR curve as a function of time mirroring that of both the f_R and temperature curves. When observed in the 2-minute stationary periods, the change in HR expressed by the mean RR interval exceeded 2 SD of the HR observed in the control condition after 63 (48–73) min and reached a first maximum at 115 (95–119) min, which corresponded to an amplitude of change of 5 SD. The second maximum was observed after more than 270 min. No significant relationship was found between HR and temperature.

Moreover, LPS injection significantly increased the number of cardiac decelerations (duration < 5 seconds) [37 (33, 89) vs. 19 (13, 34) $p = 0.05$] (Figure 4B). No bradycardia > 5 seconds was observed in either condition.

The timing of changes in HRV were similar to the changes in HR (Table 2). The overall significant decrease in mean RR observed in all lambs was associated with a decrease in HRV, as measured by LF and HF (frequency-domain analysis), SD1 and SD2 (Poincaré plot), as well as AC and DC (nonlinear analysis). Notably, results from the horizontal and vertical visibility analyses showed a highly significant decrease in most of the indices (mean degree, assortativity, and transitivity) computed from network representations (Table 2). Marked alterations in the organization of the latter were also readily apparent, as exemplified by

the unequivocal decrease in connectivity and loss of well-defined hubs following LPS injection illustrated (see Figure 5).

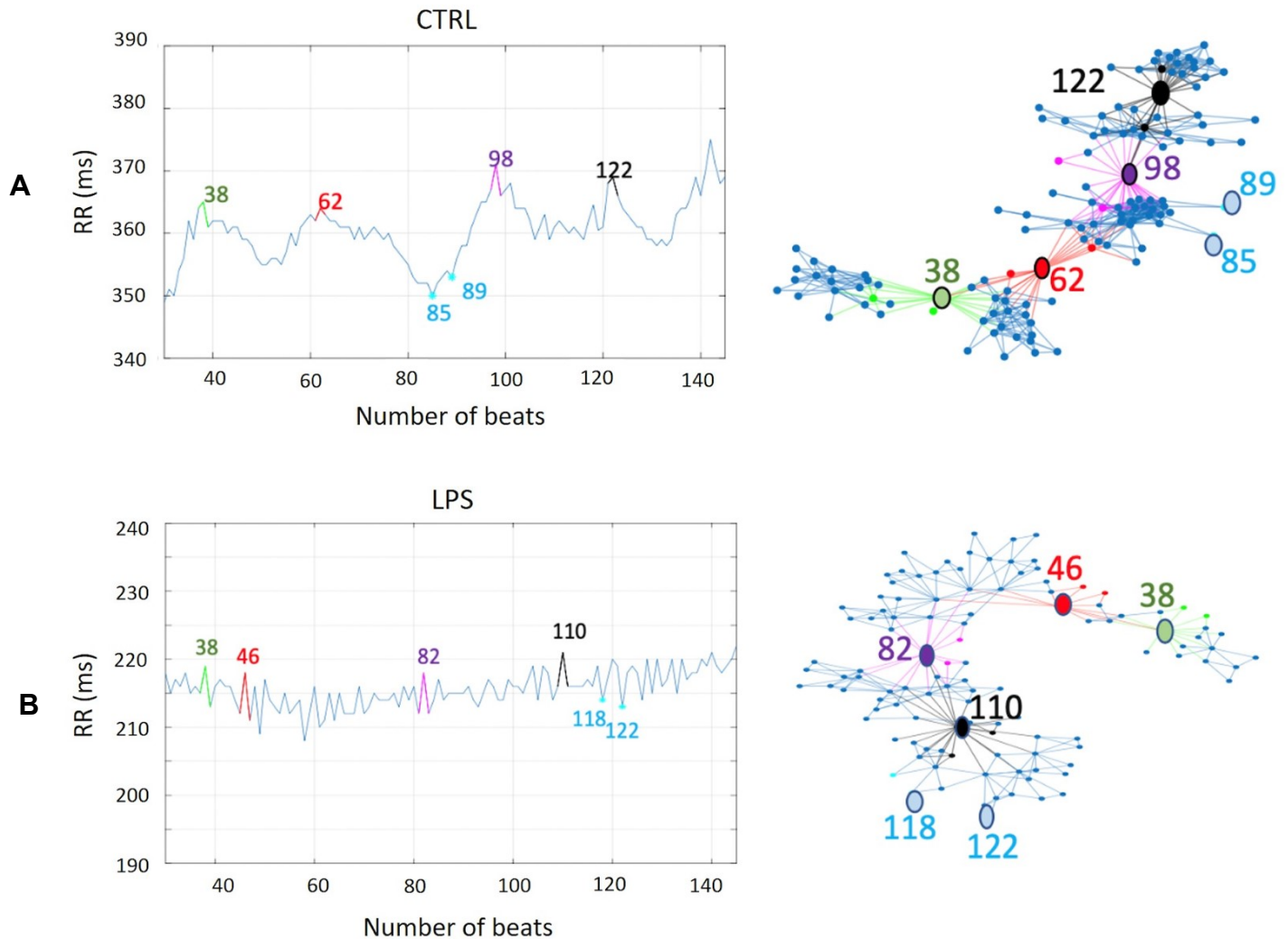


Figure 5. Impact of lipopolysaccharide injection on network representation of vertical visibility analysis of RR time series in one lamb

Impact of lipopolysaccharide injection on network representation of vertical visibility analysis of RR time series in one lamb. **(A)** The evolution of a RR time series (left) and the corresponding dimensionless network representation of the vertical visibility graph analysis computed with a horizon of 30 points (right). Some noteworthy nodes are annotated. For example, nodes 85 and 89, which are minima of the RR time series, have very few connections with the other nodes. Other nodes on the outer side are also minima. On the contrary, nodes 38, 62, 98, and 122—respectively in green, red, magenta, and black—are examples of maxima of the RR time series. The links (edges) in the same color show the multiple connections they have with the nearest neighbors. These maxima-related nodes are separated by subnetworks of highly connected nodes (in blue), whose

size is related to the horizon distance. Note the overall high density of the links between nodes, which reflects the high cardiac variability in control condition. **(B)** A similar illustration following lipopolysaccharide injection in the same lamb. Similar to **(A)**, nodes 118 and 122—examples of minima of the RR time series—have very few connections with the other nodes. Contrary to **(A)** (representing the control condition), nodes 38, 46, 82, and 110—examples of maxima of the time series—are much less distinct nodes of the network. In addition, the subnetworks between these maxima-related nodes are barely identifiable, due to the fewer connections compared to the control condition. Such decreased connectivity attests to the low heart-rate variability, indicating an abnormal and inadequate adaptation of the autonomic nervous system. Of note, the orientation of the network representations has no particular meaning; it was only chosen to facilitate network interpretation.

Mean systemic arterial blood pressure. Overall, no significant difference was observed for MAP between the LPS and control conditions [67.7 (63.9, 70.4) vs. 64.3 (61.5, 68.7) mmHg, $p = 0.6$]; moreover, there was no significant relationship between MAP and temperature (Figure 3C).

Cardiorespiratory interrelations. A decrease in both the phase synchronization and the magnitude of the respiratory sinus arrhythmia was observed, indicating a significant decrease in cardiorespiratory interactions (Table 2).

Impact of LPS injection on the reflexivity of the autonomic nervous system

Laryngeal chemoreflexes. No significant difference was observed for the cardiorespiratory components of the laryngeal chemoreflexes after LPS compared to saline injection, except for a significantly larger decrease in O₂ hemoglobin saturation at 30 minutes compared to 24 hours after LPS injection [2 (2, 3) vs. 1 (1, 2) %, $p = 0.03$] (Table 3).

Pulmonary chemoreflexes. No significant difference was observed for the cardiorespiratory components of the pulmonary chemoreflexes after LPS compared to saline injection, except for a significantly more important decrease in O₂ hemoglobin saturation 2 hours after LPS injection compared to baseline [4 (2, 5) vs. 2 (1, 2) %, $p = 0.02$] (Table 3).

Table 3. Absence of effects of LPS injection on the cardiorespiratory components of the laryngeal and pulmonary chemoreflexes in full-term lambs.

	Baseline		30 minutes post-LPS injection		2 hours post-LPS injection		24 hours post-LPS injection	
	LCR	PCR	LCR	PCR	LCR	PCR	LCR	PCR
No of. apneas	0 (0, 0)	1 (1, 1)	1 (0, 1)	2 (1, 2)	0 (0, 0)	1 (1, 2)	0 (0, 0)	1 (1, 1)
Total apnea duration, s	0 (0, 1.2)	4.8 (3.3, 8.2)	1.2 (0, 5.5)	7.8 (6.4, 15)	0 (0, 0)	7.3 (3.3, 16.5)	0 (0, 0)	7.9 (4, 9.3)
HR decrease, %	27 (23, 56)	73 (78, 70)	39 (20, 63)	81 (38, 88)	48 (32, 62)	86 (77, 89)	34 (30, 50)	78 (70, 82)
No. of cardiac decelerations	0 (0, 3)	8 (5, 8)	1 (0, 3)	5 (1, 8)	1 (1, 3)	12 (6, 13)	1 (1, 2)	8 (5, 11)
No. of bradycardias	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	1 (0, 1)	0 (0, 0)	0 (0, 1)	0 (0, 0)	0 (0, 0)
Total cardiac inhibition duration, s	0 (0, 1.7)	5.1 (4, 11)	0.3 (0, 1.6)	7.9 (4.9, 16.2)	0.5 (0.2, 2.2)	7.7 (6.2, 22.1)	0.65 (0.44, 0.82)	7 (5.8, 9.9)
SpO ₂ decrease, %	1 (1, 1)	2 (1, 2)	2 (2, 3)‡		2 (1, 3)	4 (2, 5)*	1 (1, 2)	1 (1, 3)

LCR, laryngeal chemoreflexes; PCR, pulmonary chemoreflexes; HR, heart rate; SpO₂, hemoglobin saturation in oxygen. Results are expressed as median (Q1, Q3) before LPS injection (baseline) and at 30 min, 2 and 24 h after LPS; n = 8 full-term lambs for each group. $p < 0.05$, * vs. baseline, ‡ vs. 24 hours after LPS. The absence of SpO₂ data 30 minutes after LPS injection is due to the fact that the oximetry sensor does not work when HR exceeds 300/min.

Preliminary results on brainstem inflammation

IL-8 and TNF- α mRNA expression. A tendency towards an increase in mRNA expression of the early onset inflammatory mediators IL-8 and TNF- α was observed 6 hours after LPS injection in four lambs compared to four controls (Figure 6).

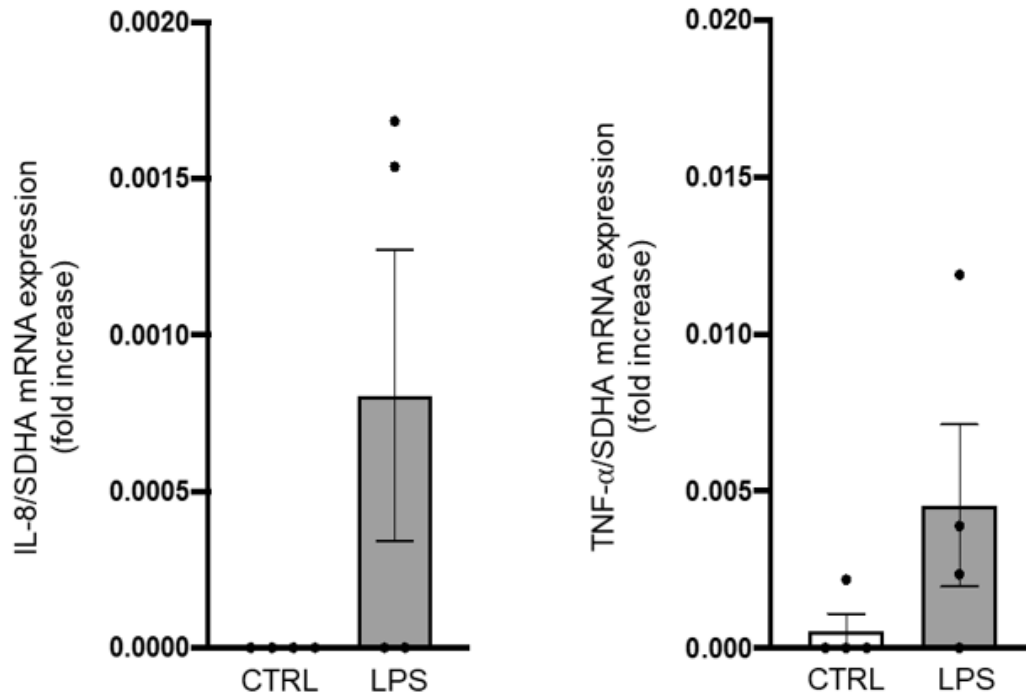


Figure 6. Assessment of brainstem inflammation following systemic lipopolysaccharides injection. Quantitative RT-PCRs in whole brainstem tissue show an increased IL-8 and TNF- α mRNA expression in LPS-injected lambs compared to control lambs. Results are expressed as fold increase compared to an endogenous control (the housekeeping gene SDHA) and presented as mean \pm SD ($n = 4$ lambs per group).

Microglial cell activation in the rostral ventrolateral medulla region. Qualitative analyses performed in the medulla oblongata to assess morphological changes of microglial cells suggested an increased number of activated cells in the LPS-injected lamb compared to the control lamb. Meanwhile, the quantitative 3DMorph analysis of microglial cells on 6 images/lamb from the rostral ventrolateral medulla region showed a larger cell body volume [median (IQR): 1148 (1122) vs. 839 (825) μm^3]; [mean \pm SEM: 1425 \pm 93 vs. 968 \pm 93].

79 μm^3], a larger total territorial volume [8862 (11729) vs. 5267 (7629) μm^3]; [11414 \pm 876 vs. 7996 \pm 983 μm^3] occupied by microglial cells and fewer processes with shorter branch length [0 (27.9) vs. 16.5 (34.5) μm]; [14.8 \pm 2.2 vs. 19.2 \pm 3.0 μm] in the LPS-injected lamb compared to the control lamb (Figure 7).

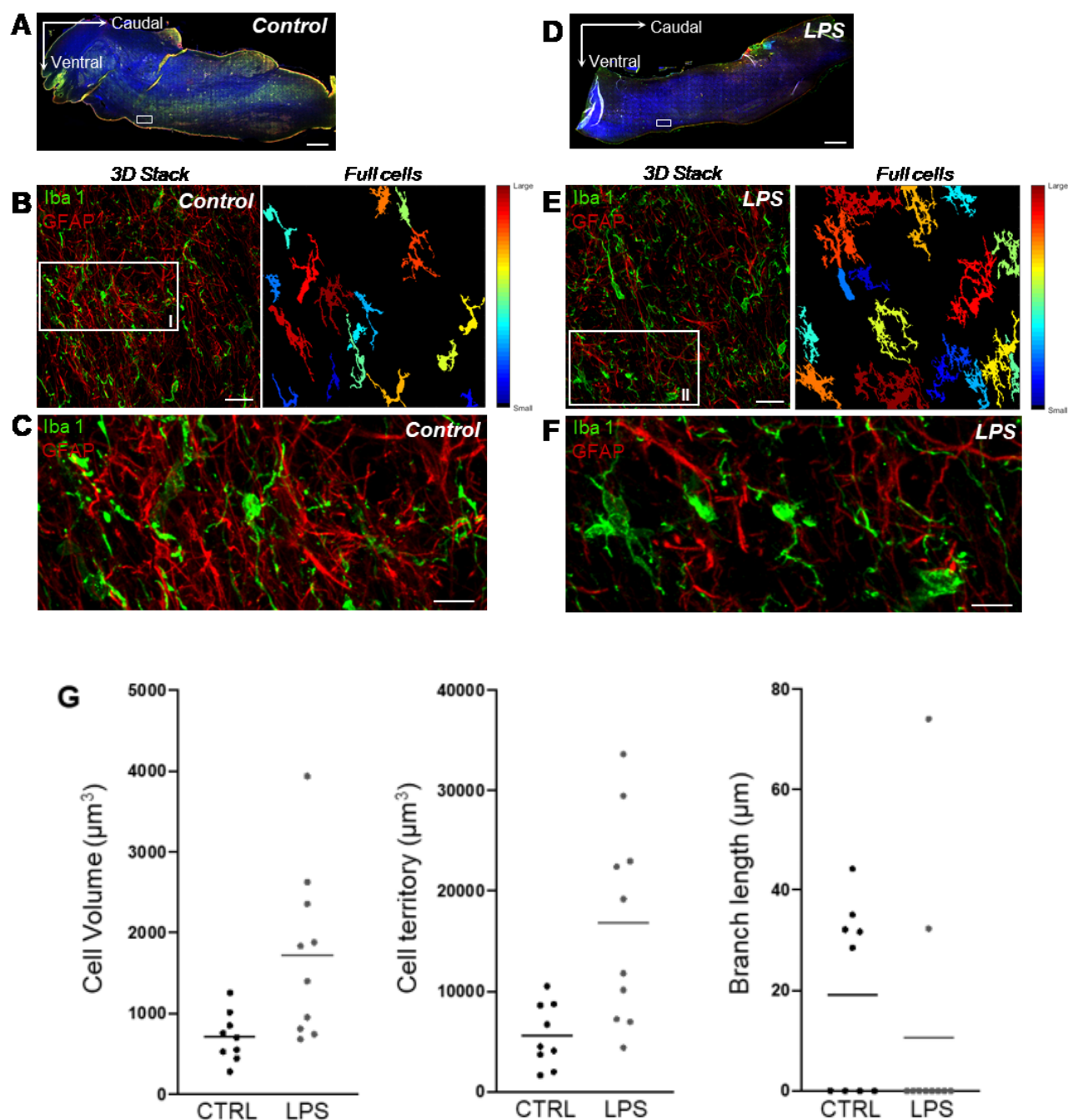


Figure 7. Quantitative analysis of microglial-cell morphology in the rostral ventrolateral region of the medulla.

(A, D) Axioscan images of whole brainstem (AxioScan.Z1scanner, Carl Zeiss, Jena, Germany) showing targeted areas from the rostral ventrolateral region of the medulla (white boxes) in one control (left) and one LPS-injected (right) lamb. Scale bar: 1000 μm .

(B, E) Example of a 3D confocal image stack with full-cell segmentation automatically generated by 3DMorph MATLAB-based script showing how quantitative morphological analysis of microglial cells

(Iba1-positive cells, green) is performed. The full-cell segmentation shows remaining microglial cells after exclusion of partial cells and small processes not related to a cell body. Scale bar: 35 μm .

(C, F) High magnification of the same medullary areas allows for appreciation of the morphological changes of the activated microglial cells in the LPS-injected lamb compared to the resting state in the control lamb. Qualitative analysis thus reveals a higher number of microglial cells with a larger cell-body surface, a larger total territory occupied by microglial cells, and shorter branch length in the LPS-injected lamb. Meanwhile, qualitative assessment of astrogliosis (GFAP-positive cells, red) does not suggest differences between the LPS-injected and the control lamb over the same medullary regions. Scale bar: 10 μm .

(G) 3DMorph quantitative analysis of microglial-cell morphology from the above images (C, F) shows an increased average cell volume and territorial volume, as well as smaller branch length in the LPS-injected compared to the control lamb.

DISCUSSION

This study provides new observations on the physiological alterations and their dynamics during the first 6 hours of a systemic inflammation induced by lipopolysaccharide injection in a full-term newborn ovine model. Overall, we observed that the general effects of the LPS condition started within the first hour following the injection as a decrease in locomotor activity and active wakefulness as well as diarrhea and a biphasic increase in body core temperature. While the latter was mirrored by a simultaneous biphasic increase in respiratory frequency, the biphasic increase in heart rate was unexpectedly delayed. Moreover, an increase in the number of short cardiac decelerations was observed. Finally, LPS injection was followed by an overall decrease in both HRV and RRV, indicating an overall decrease in cardiac and respiratory regulatory capacity. Interestingly, the unique use of network analysis of HRV revealed especially marked alterations, suggesting such analysis might be of clinical importance for earlier recognition of neonatal sepsis.

Our neonatal ovine model of LPS-induced systemic inflammation

An extensive review of the literature revealed that there are only a few reports on newborn ovine models of systemic inflammation using *E.coli* LPS (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005; Hamilton et al., 2006; Feng et al., 2010). In these reports, LPS doses ranging from 200 ng/kg to 3 µg/kg were administered, either as a bolus or infusion over 30 minutes. The 2.5 µg/kg bolus in our study was selected based on our pilot studies as the lowest dose of LPS that induced fever, decreased activity and diarrhea, as well as increased HR and f_R in lambs. This model hence mimics the systemic inflammation observed with bacterial sepsis without causing septic shock, as encountered, for instance, in the first hours of LOS in preterm newborns (Shane et al., 2017).

No previous studies on the effects of *E.coli* LPS in lambs (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005; Hamilton et al., 2006; Feng et al., 2010) specifically described alterations of cardiorespiratory control, apart from a brief mention of a marked increase in heart rate and

respiratory frequency without any further details (Billiards et al., 2002). The systemic inflammation observed with bacterial sepsis was also mimicked by *E. coli* LPS injection in newborn rats (Olsson et al., 2003; McDonald et al., 2016a,b), mice (Mukherjee et al., 2010), piglets (McDeigan et al., 2003), and adult goats (Takeuchi et al., 1997). In neonatal rats, LPS injection tended to reduce f_R and the ability to autoresuscitate from an anoxic challenge (Olsson et al., 2003). Conversely, previous observations in newborn rats (McDonald et al., 2016b) and piglets (McDeigan et al., 2003) showed that LPS injection did not alter respiratory variables during normoxia. In neonatal mice, LPS injection increased HR and altered cardiac performance (Mukherjee et al., 2010), while, in adult sheep, LPS injection reduced MAP, HR, and cardiac index after 60 min (Ferrara et al., 2019). Finally, studies demonstrated that LPS injection tended to increase HR during the first 210 min in adult goats (Takeuchi et al., 1997) and significantly increased HR at higher ambient temperature (38°C) in rat pups (McDonald et al., 2016a). Overall, no clear picture emerged from past data, which might be related to the wide range of doses, the variable route of LPS administration, and ambient conditions. The LPS dose we used in lambs was selected to induce cardiorespiratory alterations during normoxia and in a neutral range of ambient temperature in order to mimic the systemic inflammation observed during the initial phase of bacterial sepsis without septic shock.

Our study provides unique observations, especially on cardiorespiratory alterations, in a neonatal model close to the full-term human newborn with bacterial sepsis. Although our full-term lamb model of systemic inflammation does not yet represent the preterm newborn with bacterial sepsis, our observations pave the way for further studies in our unique chronic preterm lamb model (Boudaa et al., 2013).

Effect of lipopolysaccharide injection on body core temperature

The dose of LPS used (2.5 µg/kg) in our study induced a biphasic increase in rectal temperature, which is characteristic of the reaction to LPS injection in most animal species (Roth and Blatteis, 2014), including in lambs aged < 20 days (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005). Several mechanisms are involved in the complex pathogenesis of this biphasic fever. They include activation of both TLR4 and the complement cascade, which results in the production/release of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α (via activation of the NF κ B-pathway) and of PGE₂ (via cyclooxygenase and PGE synthase induction). Macrophages in the liver (Küpfper cells) are especially involved in the production of these endogenous pyrogens initially. The pyrogenic message is then conveyed to the preoptic-area neurons in the hypothalamus, raising, in turn, the set point of the thermoregulatory center, via both a vagal afferent and a humoral pathway, in part explaining the early and late febrile phases, respectively (Roth and Blatteis, 2014; McDonald et al., 2017). Fever accelerates metabolism, promotes healing, and appears to inhibit bacterial growth. Thereby, this elevation in body temperature in our lamb model appears to be an appropriate central inflammatory response to LPS (Blomqvist and Engblom, 2018). Of note, moderate fever (temperature > 38°C) is a common though inconsistent clinical sign in human newborns with sepsis (Kerste et al., 2016; Wu et al., 2017).

Effect of lipopolysaccharide injection on locomotor activity and sleep states

Limited data are available on LPS-induced clinical manifestations in newborn animals. In our study, LPS injection decreased lamb locomotor activity compared to the control condition, as reported previously (Roth and Blatteis, 2014). The proposed mechanism behind this reduction in locomotor activity is the involvement of pro-inflammatory cytokines, which act on the brain during infection in order to induce a sickness behavioral response characterized by drowsiness, loss of appetite, and decreased activity (Norheim et al., 2011). Although the increase in NREM sleep duration in the LPS condition compared to the control condition did not reach significance in this study on lambs, quiet wakefulness was increased

at the expense of active wakefulness in the LPS condition. This is consistent with a past report of an increase in drowsiness and NREM sleep in lambs after LPS injection (Billiards et al., 2002). The latter similarly increased NREM sleep in rodents and rabbits, while experimental results in healthy adult humans depended on the dose used, with NREM sleep being suppressed at high dose but increased at mild dose (Mullington et al., 2000). Alterations in alertness states, especially NREM sleep, are mediated by the action of cytokines on both individual sleep neuronal circuits and the sleep regulatory centers, such as the basal forebrain and preoptic area (Kapsimalis et al., 2005). Systemic cytokines affect brain function either via vagal afferent messages or by being transported across the blood–brain barrier. Central mechanisms of action involve neurotransmitters such as NO, adenosine, and glutamate receptor trafficking (Krueger and Opp, 2016). Of note, prostaglandins are also known to be involved in sleep regulation (Krueger and Opp, 2016).

Effect of lipopolysaccharide injection on cardiorespiratory control

The main focus of our study was to investigate the effects of LPS injection on neonatal cardiorespiratory control. To our knowledge, this represents the first time that cardiorespiratory activity has been serially analyzed for several hours after LPS injection in a newborn animal. Overall, results showed an increase in both HR and f_R with no consistent changes in MAP. Interestingly, tachypnea, tachycardia, and HRV alterations are well-known signs of early- or late-onset sepsis in newborn humans (Griffin et al., 2005; Beuchée et al., 2009; Fairchild, 2013; Bohanon et al., 2015; Kerste et al., 2016; Nguyen et al., 2017; Wu et al., 2017).

Respiratory activity

The biphasic increase in f_R we observed in lambs occurred early after LPS injection, was coincidental to the biphasic increase in temperature, and was associated with a decrease in RRV. Consequently, while a mild acute lung injury directly induced by intravenous LPS might have contributed to this increase (Wang et al., 2008), the in-phase increase in both f_R and

temperature rather suggests a central effect of LPS-induced inflammation. It appears difficult, however, to attribute this to PGE₂, which has been reported to inhibit respiratory activity, in particular by its effects on the prostaglandin EP3 receptors of neurons of the ventral respiratory column (Hoffstetter et al., 2007; Siljehav et al., 2015; Forsberg et al., 2017). Of note, in contrast to our current results, intravenous LPS was reported to cause no respiratory alteration in neonatal rat pups (McDonald et al., 2016a,b) and piglets (McDeigan et al., 2003), or a small (insignificant) decrease in f_R in neonatal rat pups (Olsson et al., 2003). Discrepant results between those publications and our current study might be due to a number of methodological differences, including the LPS dose and administration route, timing of the measurement after LPS injection, and differences in species and age of the newborn animals.

Cardiac activity

The increase in HR observed after LPS injection is consistent with past results in neonatal models (Mukherjee et al., 2010; McDonald et al., 2016a,b). It is ascribed to the LPS-induced increase in pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-6, IL-1 β , TNF- α) (Kenney and Ganta, 2014; Badke et al., 2018), which have a sympathoexcitatory effect. The latter is partly mediated by prostaglandin E₂ acting on the prostaglandin EP3 receptors present at multiple sites in the central nervous system, including in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, which signals the ventrolateral medulla and downstream sympathetic pathways (Kenney and Ganta, 2014).

Our observation of highly significant and early alterations in HRV following LPS injection is consistent with current pathophysiological knowledge. It can be interpreted as an early temporal disorganization of HR with a loss of adaptability due to an altered structure of the control system (Griffin et al., 2005; Beuchée et al., 2009; Madl, 2016). In this respect, it is worth mentioning that ours is the first report of a marked decrease in the indices that quantify the connectivity of the network representating the visibility graph analysis of HRV in the context of systemic neonatal inflammation. A novel message from the current results

in lambs is that this decrease in network connectivity indices appears to be more pronounced than the alterations in the indices computed with the linear and nonlinear analyses of HRV used to date. Of note, we (GC, PP) have made similar observations in preterm infants with LOS (unpublished results). Visibility graph analyses might consequently provide an earlier and more sensitive means to diagnose LOS in preterm infants. The latter hypothesis currently constitutes most of the relevance for performing visibility graph analyses, although this remains to be substantiated in future clinical studies. Lastly, from a physiological standpoint, it must be recognized that, beyond the temporal disorganization of HR, we currently have no information on the detailed alterations in the HR control system, which could explain the decreased connectivity of the networks resulting from visibility graph analyses. Such explanations would need physiological studies aiming to assess the effect of manipulating the sympathetic and parasympathetic branches of the autonomic nervous system on the results of visibility graph analyses, as described for past HRV analyses (Draghici and Taylor, 2016).

The unique observation of the manifest dissociation between the biphasic increase in HR and temperature is intriguing. It is reminiscent of the relative bradycardia (or sphygmothermic dissociation) observed in some infectious conditions such as salmonella infections (Ye et al., 2018). This relative bradycardia is thought to result from the complex interactions existing between the immune system and the sympathetic and parasympathetic arms of the autonomic system in the presence of inflammation (Kenney and Genta, 2014). A simplistic scheme would be that the increase in pro-inflammatory cytokines consequent to endotoxin injection triggers parasympathetic activation, which decreases heart rate. The latter, in turn, leads to sympathetic activation, which is then responsible for an increase in heart rate (Ye et al., 2018). Lastly, while reminiscent of the bradycardias specifically observed with neonatal infections (Beuchée et al., 2009), the overall increased number of cardiac decelerations after LPS injection compared to the control condition might be due a central effect of PGE_2 . In this respect, PGE_2 infusion has

been shown to slow heart rate in fetal sheep (Savich et al., 1995). Of note, we did not find any evidence of increased parasympathetic activity to explain the cardiac decelerations.

Absence of effect of lipopolysaccharide injection on cardiorespiratory reflex responses

Results from a past study by our team showed that the presence of brainstem inflammation induced by a moderate hyperbilirubinemia blunted the cardiorespiratory inhibition normally observed during both laryngeal and pulmonary chemoreflexes (Specq et al., 2016). The absence of any effect in the present experiments in full-term lambs, despite a preliminary indication (see next paragraph) that brainstem inflammation was also present, is probably be linked to the fact that the former study was performed on preterm lambs. Indeed, although a very significant cardiorespiratory inhibitory response was usually present in the latter, especially during the laryngeal chemoreflexes, this was not the case for full-term lambs, making the possibility to observe a decrease in this cardiorespiratory inhibition unlikely. In addition, there was no enhancement of this response, which would have also been a possibility in the context of the inflammatory reflex, in which efferent vagal activity is a major component (Tracey, 2002).

Preliminary results on brainstem inflammation

Although very preliminary, we believe that our results showing a trend for an increased mRNA expression of the early inflammatory markers IL-8 and TNF- α in the brainstem, as well as activation of microglial cells in the region of the rostral ventrolateral medulla, are significant. Indeed, they provide proof of principle that inflammation can be shown in the vicinity of important cardiorespiratory centers in LPS-injected newborn lambs. Such inflammation might, at least partly, explain the cardiorespiratory alterations that we report herein. Our preliminary results hence are in agreement and extend past reports on rodents that cytokines in the brainstem, either produced locally—especially by microglial cells—or accessing the brain via the circumventricular organs, can alter the neuronal function

involved in respiratory control in early life, in part via PGE₂ synthesis (Gresham et al., 2011; Stojanovska et al., 2018).

Although several explanations might account for the fact that an increase in IL-8 and TNF- α mRNA was not detected in all lambs 6 hours after LPS injection, the interindividual variability of the time lag between LPS injection and the inflammatory response is the most likely. Past studies in fetal lambs reported that the highest serum level of IL-6 and TNF- α was measured between 3 and 6 hours after systemic injection of LPS in fetal lambs (Durosier et al., 2015; Herry et al., 2016). Given the expectation that cytokine production and release by the nervous system will peak later on, our six-hour timepoint might be too early to observe a consistent increase in cytokine mRNA expression in the lambs' brainstem.

Study limitations

The main goal of our study was to further characterize the cardiorespiratory alterations observed during several hours after LPS injection in full-term newborn lambs. Systemic injection of LPS, especially in mice, has been widely used as a preclinical model of sepsis. It has been shown, however, not to fully replicate the systemic inflammation observed during sepsis, whose onset is more progressive and duration longer. Although the effects of LPS injection in lambs appear closer to those observed in humans (e.g., for the dose needed to induce a significant systemic inflammation) their temporal characteristics are still different from those observed with sepsis (Zanotti-Cavazzoni and Goldfarb, 2009). Hence, our lamb model studied herein is mostly a model of acute, transient systemic inflammation.

While the tachycardia and tachypnea we observed in the lambs are recognized signs of neonatal sepsis in human newborns, we did not observe the severe apneas/bradycardias that can reveal systemic infection in the human infant during the very first weeks of life, especially in the preterm infant with LOS (Weber et al., 2008; Beuchée et al., 2009; Zuckerbraun et al., 2009). This was not unexpected, however, since cardiorespiratory events associated with sepsis are less frequent in full-term than preterm human newborns.

In this respect, our results in full-term lambs must be seen as a first step paving the way for further studies in a preterm lamb model of systemic inflammation with cardiorespiratory control immaturity (Renolleau et al., 1999; St-Hilaire et al., 2007; Nault et al., 2017).

As already alluded to, while our preliminary results showing an increase in cytokine mRNA expression and microglial activity suggest the presence of brainstem inflammation in newborn lambs 6 hours after LPS injection, they only provide a proof of concept. These preliminary observations must be considered as the very first step in studying inflammation in the vicinity of cardiorespiratory centers and will have to be rounded out with a greater number of analyses in lambs, especially preterms.

Lastly, given that neonatal sepsis can also result from a viral infection, we believe that further studies with a lamb model of systemic inflammation mimicking that induced by a viral infection would be relevant to characterize its effects on cardiorespiratory control. For example, this could involve IV injection of poly I:C—a classical TLR3 agonist involved in infections by rhinovirus, respiratory syncytial virus, and influenza virus. The results from such a study could be compared to our current results.

CONCLUSION

Our study confirmed that LPS injection in full-term newborn lambs reproduces several features of the systemic inflammation observed in the early phase of bacterial sepsis, including cardiorespiratory control alterations. The latter are complex, as uniquely shown, for instance, by the simultaneous biphasic increase in temperature and respiratory frequency, contrasting with the unexplained delay in increased heart rate. In addition, we believe that the highly significant alterations in heart rate variability shown by visibility graph analyses uniquely applied to systemic inflammation are clinically relevant as a novel means to provide an earlier diagnosis of late-onset sepsis in preterm human newborns. Further studies are needed in a preterm ovine model to better mimic the conditions encountered in preterm infants with late-onset sepsis. In addition, studies in preterm lambs will have to thoroughly characterize the inflammatory profile in the brainstem cardiorespiratory centers in order to gain further insight into the mechanisms involved and ultimately provide better care to young infants with sepsis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the help of Marie-Pierre Garant, Biostatistics Division, Research Center of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CRCHUS), as well as the help of Dr. Nadine Khodor for the network analysis.

Author contributions statement

JPP, NS, PP, SN, ST, and VC conceived and designed the study. CN and SN performed animal experiments. AL, GC, PP, RI, SAO, SN, ST, and VC analyzed the data. GC, JPP, PP, RI, SN, and ST prepared the figures. All the authors contributed to the manuscript draft. All authors revised, read, and approved the final version of the manuscript.

List of abbreviations

AC	Acceleration capacity
CTRL	Control condition
DC	Deceleration capacity
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECG	Electrocardiogram
EEG	Electroencephalogram
EOG	Electrooculogram
f_R	Respiratory frequency
HCO_3^-	Bicarbonate concentration in arterial blood
HF	High-frequency
H-MD	Horizontal mean degree
HR	Heart rate
IL-8	Interleukine 8
HRV	Heart-rate variability
LCR	Laryngeal chemoreflex
LH	Low-frequency
LOS	Late-onset sepsis
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mean systemic arterial pressure
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NREM	Non-rapid eye movement
$PaCO_2$	Partial pressure of carbon dioxide in arterial blood
PaO_2	Partial pressure of oxygen in arterial blood
PCR	Pulmonary chemoreflex
PGE_2	Prostaglandin E_2
REM	Rapid eye movement
RMSSD	Square root of the mean squared differences of successive RR intervals
RRV	Respiratory-rate variability
RSA	Respiratory sinus arrhythmia
SampEn	Sample entropy
SD1	Short-term heart-rate variability
SD2	Long-term heart-rate variability
SpO_2	Oxygen hemoglobin saturation
$TNF\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TLR4	Toll-like receptor 4
V-MD	Vertical mean degree

REFERENCES

- Al-Omar, S., Le Rolle, V., Samson, N., Specq, M.L., Bourgoïn-Heck, M., Costet, N., Carrault, G., Praud, J.P. (2019). Influence of moderate hyperbilirubinemia on cardiorespiratory control in preterm lambs. *Front Physiol.* 10:468. doi: 10.3389/fphys.2019.00468.
- Al-Omar, S., Le Rolle, V., Beuchée, A., Samson, N., Praud, J.P., Carrault, G. (2018). Assessment of tobacco smoke effects on neonatal cardiorespiratory control using a semi-automated processing approach. *Med Biol Eng Comput.* 56:2025-2037. doi: 10.1007/s11517-018-1827-y.
- Badke, C.M., Marsillio, L.E., Weese-Mayer, D.E., Sanchez-Pinto, L.N. (2018). Autonomic nervous system dysfunction in pediatric sepsis. *Front Pediatr.* 6:280. doi: 10.3389/fped.2018.00280.
- Beuchée, A., Carrault, G., Bansard, J.Y., Boutaric, E., Bétrémieux, P., Pladys, P. (2009). Uncorellated randomness of the heart rate is associated with sepsis in sick premature infants. *Neonatology.* 96(2):109-114. doi: 10.1159/000208792.
- Beuchée, A., Nsegbe, E., St-Hilaire, M., Carrault, G., Branger, B., Pladys, P., Praud, J.P. (2007). Prolonged dynamic changes in autonomic heart rate modulation induced by acid laryngeal stimulation in nonsedated lambs. *Neonatology.* 91:83-91. doi: 10.1159/000097124.
- Billiards, S.S., Walker, D.W., Canny, B.J., Hirst, J.J. (2002). Endotoxin increases sleep and brain allopregnanolone concentrations in newborn lambs. *Pediatr Res.* 52(6):892-899. doi: 10.1203/00006450-200212000-00014.
- Blomqvist, A., Engblom, D. (2018). Neural mechanisms of inflammation-induced fever. *Neuroscientist.* 24(4): 381-399. doi: 10.1177/1073858418760481.
- Bohanon, F.J., Mrazek, A.A., Shabana, M.T., Mims, S., Radhakrishnan, G.L., Kramer, G.C., Radhakrishnan, R.S. (2015). Heart rate variability analysis is more sensitive at identifying neonatal sepsis than conventional vital signs. *Am J Surg.* 210(4):661-667. doi: 10.1016/j.amjsurg.2015.06.002.
- Borgnat, P., Flandrin, P., Honeine, P., Richard, C., Xiao, J. (2010). Testing stationarity with surrogates: a time-frequency approach. *IEEE Trans Signal Process.* 58(7):3459–3470. doi: 10.1109/TSP.2010.2043971.
- Boudaa, N., Samson, N., Carrière, V., Germim, P.S., Pasquier, J.C., Bairam, A., Praud, J.P. (2013). Effects of caffeine and/or nasal CPAP treatment on laryngeal chemoreflexes in preterm lambs. *J Appl Physiol.* 114(5): 637-646. doi: 10.1152/japplphysiol.00599.2012.

Carroll, M.S., Kenny, A.S., Patwari, P.P., Ramirez, J.M., Weese-Mayer, D.E. (2012). Respiratory and cardiovascular indicators of autonomic nervous system dysregulation in familial dysautonomia. *Pediatr Pulmonol.* 47(7), 682–691. doi: 10.1002/ppul.21600.

Coggins, S.A., Weitkamp, J.H., Grunwald, L., Stark, A.R., Reese, J., Walsh, W., Wynn, J.L. (2016). Heart rate characteristic index monitoring for bloodstream infection in an NICU: a 3-year experience. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 101(4): F329-32. doi: 10.1136/archdischild-2015-309210.

Diaz, V., Dorion, D., Renolleau, S., Létourneau, P., Kianicka, I., Praud, J.P. (1999). Effects of capsaicin pretreatment on expiratory laryngeal closure during pulmonary edema in lambs. *J Appl Physiol.* 86: 1570–1577. doi: 10.1152/jappl.1999.86.5.1570.

Draghici, A.E., Taylor, J.A. (2016). The physiological basis and measurement of heart rate variability in humans. *J Physiol Anthropol.* 35:22. <https://doi.org/10.1186/s40101-016-0113-7>.

Durosier L.D., Herry C.L., Cortes, M., Cao M., Burns P., Desrochers A., Fecteau G., Seely A.J., Frasc M.G. (2015). Does heart rate variability reflect the systemic inflammatory response in a fetal sheep model of lipopolysaccharide-induced sepsis? *Physiol Meas.* 36(10): 2089-102. doi: 10.1088/0967-3334/36/10/2089.

Duvareille, C., Beaudry, B., St-Hilaire, M., Boheimier, M., Brunel, C., Micheau, P., Praud, J.P. (2010). Validation of a new automatic smoking machine to study the effects of cigarette smoke in newborn lambs. *Lab Anim.* 44(4): 290-297. doi: 10.1258/la.2010.009124.

Ehrlich L.C., Hu S., Sheng W.S., Sutton R.L., Rockswold G.L., Peterson P.K., Chao C.C. (1998). Cytokine regulation of human microglial cell IL-8 production. *J Immunol.* 160(4): 1944-1948. PubMed PMID: 9469457.

Fairchild, K.D. (2013). Predictive monitoring for early detection of sepsis in neonatal ICU patients. *Curr Opin Pediatr.* 25(2):172-179. doi: 10.1097/MOP.0b013e32835e8fe6.

Fanaroff, A.A., Korones, S.B., Wright, L.L., Verter, J., Poland, R.L., Bauer, C.R., Tyson, J.E., Philips, J.B 3rd., Edwards, W., Lucey, J.F., Catz, C.S., Shankaran ,S., Oh, W. (1998). Incidence, presenting features, risk factors and significance of late-onset septicemia in very low birth weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Pediatr Infect Dis J.* 17(7): 593-598. doi:10.1097/00006454-199807000-00004

Feng, S.Y., Samarasinghe, T., Phillips, D.J., Alexiou, T., Hollis, J.H., Yu, V.Y., Walker, A.M. (2010). Acute and chronic effects of endotoxin on cerebral circulation in lambs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298(3): R760-766. doi: 10.1152/ajpregu.00398.2009.

- Ferrara, G., Kanoore Edul, V.S., Caminos Eguillor, J.F., Buscetti, M.G., Canales, H.S., Lattanzio, B., Gatti, L., Ince, C., Dubin, A. (2019). Effects of fluid and norepinephrine resuscitation in a sheep model of endotoxin shock and acute kidney injury. *J Apply Physiol.* 127(3): 788-797. doi: 10.1152/jappphysiol.00172.2019.
- Forsberg, D., Ringstedt, T., Herlenius, E. Astrocytes release prostaglandin E2 to modify respiratory network activity. (2017) *Elife.* 6;6. pii: e29566. doi: 10.7554/eLife.29566.
- Gresham, K., Boyer, B., Mayer, C., Foglyano, R., Martin, R., Wilson, C.G. (2011). Airway inflammation and central respiratory control: results from in vivo and in vitro neonatal rat *Respir Physiol Neurobiol.* 178(3):414-21. doi:10.1016/j.resp.2011.05.008.
- Griffin, M.P., Lake, D.E., Bissonette, E.A., Harrell, F.E Jr., O'Shea, T.M., Moorman, J.R. (2005). Heart rate characteristics: novel physiometers to predict neonatal infection and death. *Pediatrics.* 116(5):1070-1074. doi: 10.1542/peds.2004-2461.
- Hamilton, G.S., Edwards, B., Solin, P., Walker, A.M. (2006). A model of coronary artery endothelial dysfunction in the sleeping lamb. *Sleep Med.* 7(7): 573-579. doi: 10.1016/j.sleep.2006.04.001.
- Herry C.L., Cortes M., Wu H.T., Durosier L.D., Cao M., Burns P., Desrochers A., Fecteau G., Seely A.J., Frasch M.G. (2016). Temporal Patterns in Sheep Fetal Heart Rate Variability Correlate to Systemic Cytokine Inflammatory Response: A Methodological Exploration of Monitoring Potential Using Complex Signals Bioinformatics. *PLoS One.* 11(4):e0153515. doi: 10.1371/journal.pone.0153515.
- Hofstetter, A.O., Saha, S., Siljehav, V., Jakobsson, P.J., Herlenius, E. (2007). The induced prostaglandin E2 pathway is a key regulator of the respiratory response to infection and hypoxia in neonates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(23): 9894-9899. doi: 10.1073/pnas.0611468104.
- Hotchkiss, R.S., Moldawer, L.L., Opal, S.M., Reinhart, K., Turnbull, I.R., Vincent, J.L. Sepsis and septic shock. (2016). *Nat Rev Dis Primers.* 2:16045. doi: 10.1038/nrdp.2016.45.
- Kapsimalis, F., Richardson, G., Opp, M.R., Kryger, M. (2005). Cytokines and normal sleep. *Curr Opin Pulm Med.* 11(6):481-484. doi: 10.1097/01.mcp.0000183062.98665.6b.
- Kenney, M.J., Ganta, C.K. (2014). Autonomic nervous system and immune system interactions. *Compr Physiol* 4(3):1177-200. doi: 10.1002/cphy.c130051.
- Kerste, M., Corver, J., Sonneveld, M.C., van Brakel, M., van der Linden, P.D., M Braams-Lisman, B.A., Plötz, FB. (2016). Application of sepsis calculator in newborns with suspected infection. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 29(23):3860-3865. doi: 10.3109/14767058.2016.1149563.

Krueger, J.M., Opp, MR. (2016). Sleep and microbes. *Int Rev Neurobiol.* 131:207-225. doi: 10.1016/bs.irn.2016.07.003.

Lacasa, L., Luque, B., Ballesteros, F., Luque, J., Carlos Nuño, J. (2008). From time series to complex networks: The visibility graph. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(13): 4972-4975. doi: 10.1073/pnas.0709247105

Luque B, Lacasa L, Ballesteros F, Luque J (2009). Horizontal visibility graphs: Exact results for random time series. *Physical Review.* 80(4):046103

Madl, T. Network analysis of heart beat intervals using horizontal visibility graphs. (2016). *2016 Computing in Cardiology Conference.* 733-736. doi: 10.22489/CinC.2016.7868847.

Mayr, F.B., Yende, S., Angus, D.C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 5(1):4-11. doi: 10.4161/viru.27372.

McClure, L., O'Connor, A.E., Hayward, S., Jenkin, G., Walker, D.W., Phillips, D.J. (2005). Effects of age and pregnancy on the circulatory activin response of sheep to acute inflammatory challenge by lipopolysaccharide. *J Endocrinol.* 185(1): 139-149. doi: 10.1677/joe.1.06051.

McDeigan, G.E., Ladino, J., Hehre, D., Devia, C., Bancalari, E., Suguihara, C. (2003). The effect of Escherichia coli endotoxin infusion on the ventilatory response to hypoxia in unanesthetized newborn piglets. *Pediatr Res.* 53(6): 950-955. doi: 10.1203/01.PDR.0000064581.94126.1C

McDonald, F.B., Khawaja, A.M., Imran, A.A., Ellis, M.E., Chandrasekharan, K., Hasan, S.U. (2017). Thermal and cytokine responses to endotoxin challenge during early life. *Can J Physiol Pharmacol.* 95(12): 1488-1492. doi: 10.1139/cjpp-2017-0167.

McDonald, F.B., Chandrasekharan, K., Wilson, R.J., Hasan, S.U. (2016a). Interactive effects of maternal cigarette smoke, heat stress, hypoxia, and lipopolysaccharide on neonatal cardiorespiratory and cytokine responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 311(6): R1113-R1124. doi: 10.1152/ajpregu.00062.2016.

McDonald, F.B., Chandrasekharan, K., Wilson, RJ., Hasan, S.U. (2016b). Cardiorespiratory control and cytokine profile in response to heat stress, hypoxia, and lipopolysaccharide (LPS) exposure during early neonatal period. *Physiol Rep.* 4(2): pii: e12688. doi: 10.14814/phy2.12688.

Mukherjee, R., McQuinn, T.C., Dugan, M.A., Saul, J.P., Spinale, F.G. (2010). Cardiac function and circulating cytokines after endotoxin exposure in neonatal mice. *Pediatr Res.* 68(5): 381-386. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181efbe10.

Mullington, J., Korth, C., Hermann, D.M., Orth, A., Galanos, C., Holsboer, F., Pollmächer, T. (2000). Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278(4): R947-55. doi: 10.1152/ajpregu.2000.278.4.R947.

Nault, S., Samson, N., Nadeau, C., Djeddi, D., Praud, J.P. (2017). Reflex cardiorespiratory events from esophageal origin are heightened by preterm birth. *J Appl Physiol.* 123(2): 489-497. doi: 10.1152/jappphysiol.00915.

Nguyen, N., Vandenbroucke, L., Hernández, A., Pham, T., Beuchée, A., Pladys, P. (2017). Early-onset neonatal sepsis is associated with a high heart rate during automatically selected stationary periods. *Acta Paediatr.* 106(5): 749-754. doi: 10.1111/apa.13782.

Nguyen Phuc Thu, T., Hernández, A. I., Costet, N., Patural, H., Pichot, V., Carrault, G., Beuchée, A. (2019). Improving methodology in heart rate variability analysis for the premature infants: Impact of the time length. *PloS one*, 14(8): e0220692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220692>

Norheim, K.A., Jonsson, G., Omdal, R. (2011). Biological mechanisms of chronic fatigue. *Rheumatology.* 50(6): 1009-1018. doi: 10.1093/rheumatology/keq454.

Olsson, A., Kayhan, G., Lagercrantz, H., Herlenius, E. (2003). IL-1 beta depresses respiration and anoxic survival via a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats. *Pediatr Res.* 54(3): 326-331. doi: 10.1203/01.PDR.0000076665.62641.A2.

Porée, F., Creuze, V., Specq, M.L., Samson, N., Praud, J.P., Carrault, G. (2014). Non-invasive devices and methods for large animal monitoring using automated video processing. *IRBM.* 35(4): 173-181. doi: 10.1016/j.irbm.2014.02.002

Renolleau, S., Letourneau, P., Niyonsenga, T., Praud, J.P. (1999). Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apneas in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med.* 159(5 Pt 1): 1396-1404. doi: 10.1164/ajrccm.159.5.9807088.

Roth, J., Blatteis, C.M. (2014). Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol.* 4(4): 1563-1604. doi: 10.1002/cphy.c130033.

Samson, N., Dumont, S., Specq, M.L., Praud, J.P. (2011). Radio telemetry devices to monitor breathing in non-sedated animals. *Respir Physiol Neurobiol.* 179: 111-118. doi:10.1016/j.resp.2011.09.008.

Savich, R.D., Guerra, F.A., Lee, C.C., Kitterman, J.A. (1995). Prostaglandin E2 decreases fetal breathing movements, but not pulmonary blood flow, in fetal sheep. *J Appl Physiol.* 78(4):1477-1484. doi: 10.1152/jappl.1988.64.5.2160.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols.* 3(6): 1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.

- Shane, A.L., Sánchez, P.J., Stoll, B.J. (2017). Neonatal sepsis. *Lancet*. 390(10104): 1770-1780. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.
- Shi, J., and Tomasi, C. (1994). Good Features to Track. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, pp. 593-600.
- Siljehav, V., Hofstetter, A.M., Leifsdottir, K., Herlenius, E. (2015). Prostaglandin E2 mediates cardiorespiratory disturbances during infection in neonates. *J Pediatr*. 167(6): 1207-1213. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.08.053.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.D., Coopersmith, C.M., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., van der Poll, T., Vincent, J.L., Angus, D.C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23;315(8):801-810. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- Specq, M.L., Bourgoin-Heck, M., Samson, N., Corbin, F., Gestreau, C., Richer, M., Kadhim, H., Praud, J.P. (2016). Moderate hyperbilirubinemia alters neonatal cardiorespiratory control and induces inflammation in the nucleus tractus solitarius. *Front Physiol*. 7:437. doi:10.3389/fphys.2016.00437.
- St-Hilaire, M., Samson, N., Nsegbe, E., Duvareille, C., Moreau-Bussière, F., Micheau, P., Lebon, J., Praud, J.P. (2007). Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol*. 102(4):1429-1438. doi: 10.1152/jappphysiol.00977.
- Stojanovska, V., Miller, S. L., Hooper, S. B., Polglase, G. R. (2018). The Consequences of Preterm Birth and Chorioamnionitis on Brainstem Respiratory Centers: Implications for Neurochemical Development and Altered Functions by Inflammation and Prostaglandins. *Front Cell Neurosci*. 12(26). doi 10.3389/fncel.2018.00026.
- Takeuchi, Y., Kikusui, T., Kizumi, O., Ohnishi, H., Mori, Y. (1997). Pathophysiological changes evoked by lipopolysaccharide administration in goats. *J Vet Med Sci*. 59(2): 125-127. doi:10.1292/jvms.59.125.
- Tomasi, C., Kanade, T. (1991). Detection and tracking of point features. *IJCV*. 9(3):137-154.
- Tracey KJ. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*. 420(6917): 853-859. doi: 10.1038/nature01321.
- Venet, T., Pichot, V., Charier, D., Scalabre, A., Patural, H. (2018). Autonomic cardiac regulation after general anesthesia in children. *Paediatr Anaesth*. 28(10): 881-887. doi: 10.1111/pan.13468.

Wang, H.M., Bodenstein, M., Markstaller, K. (2008). Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res.* 40:305-316. doi: 10.1159/000121471.

Weber, M.A., Klein, N.J., Hartley, J.C., Lock, P.E., Malone, M., Sebire, N.J. (2008). Infection and sudden unexpected death in infancy: a systematic retrospective case review. *Lancet.* 371(9627): 1848-1853. doi:10.1016/S0140-6736(08)60798-9.

Welser-Alves, J. V., Milner, R. (2013). Microglia are the major source of TNF- α and TGF- β 1 in postnatal glial cultures; regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochem Int.* 63(1): 47–53. doi.org/10.1016/j.neuint.2013.04.007

Wu, I.H., Tsai, M.H., Lai, M.Y., Hsu, L.F., Chiang, M.C., Lien, R., Fu, R.H., Huang, H.R., Chu, S.M., Hsu, J.F. (2017). Incidence, clinical features, and implications on outcomes of neonatal late-onset sepsis with concurrent infectious focus. *BMC Infect Dis.* 17:465. doi: 10.1186/s12879-017-2574-7.

Ye, F., Hatahet, M., Youniss, M.A., Toklu, H.Z., Mazza, J.J., Yale, S. (2018). The clinical significance of relative bradycardia. *WMJ.* 117:73-78.

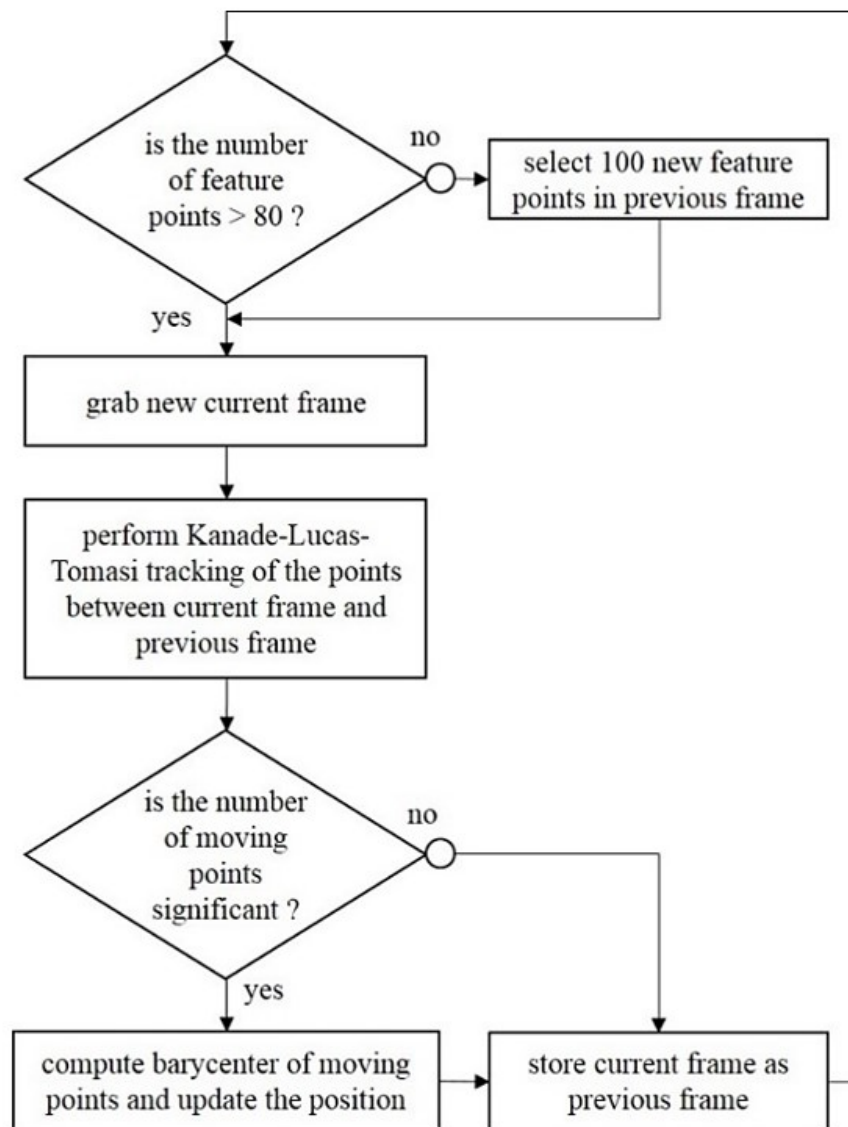
York, E.M., LeDue, J.M., Bernier, L.P., MacVicar, B.A. (2018). 3DMorph Automatic Analysis of Microglial Morphology in Three Dimensions from Ex Vivo and In Vivo Imaging. *eNeuro* 5, ENEURO.0266–18.2018–12.

Zanotti-Cavazzoni, S.L., Goldfarb, R.D. (2009). Animal models of sepsis. *Crit Care Clin.* 25(4): 703-719. doi: 10.1016/j.ccc.2009.08.005.

Zuckerbraun, N.S., Zomorodi, A., Pitetti, R.D. (2009). Occurrence of serious bacterial infection in infants aged 60 days or younger with an apparent life-threatening event. *Pediatr Emerg Care.* 25: 19-25. doi: 10.1097/PEC.0b013e318191db54.

Supplementary material

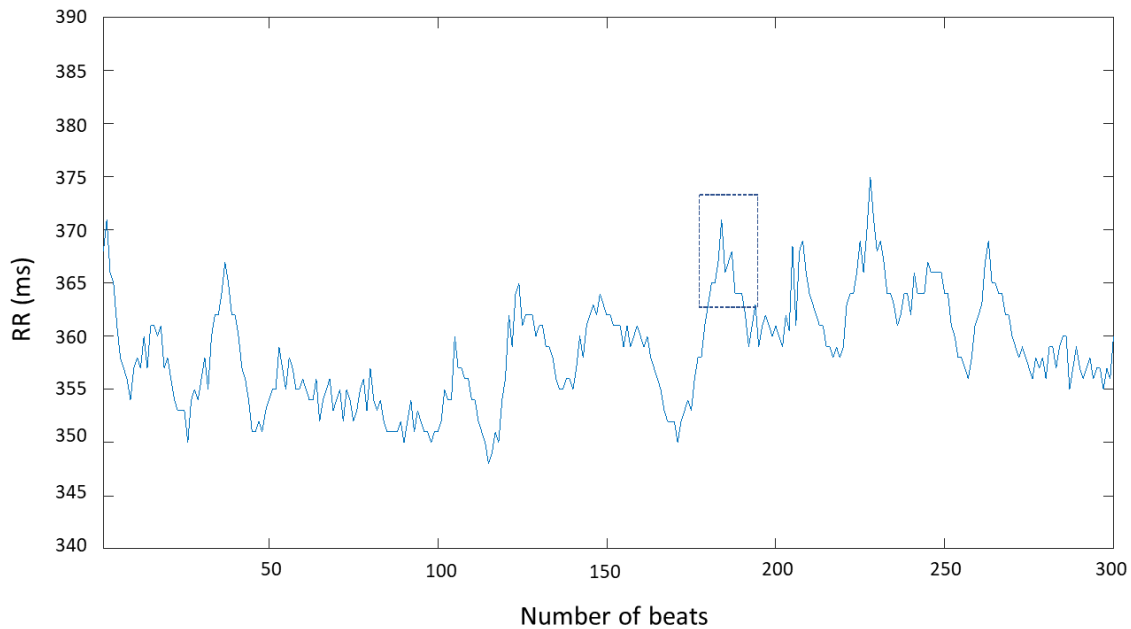
Supplementary Figure 1. Custom image-processing algorithm to detect lamb's position in the video frames.



A simple introduction to horizontal and vertical visibility graphs

Horizontal-visibility analysis

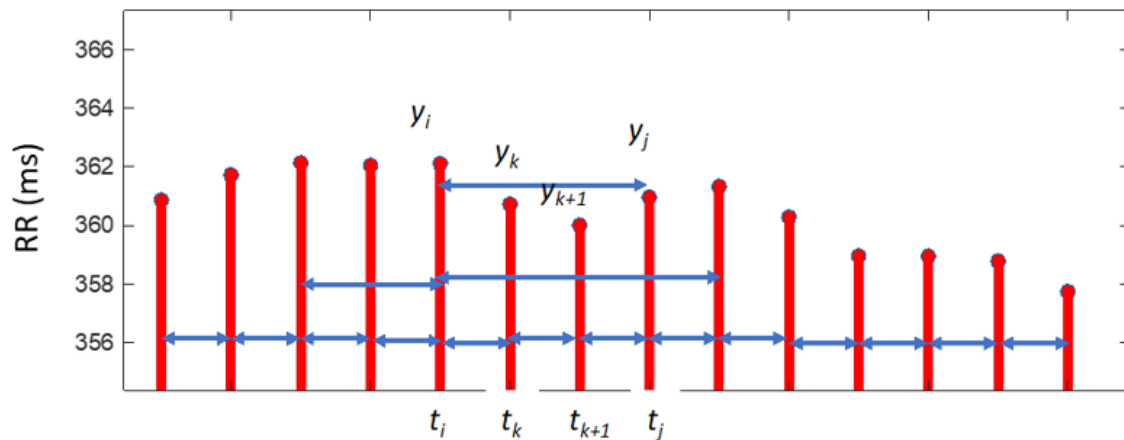
1. Suppose that we observed the following RR time series in which each point is characterized by a doublet (t_i, y_i) , t_i being the i^{th} beat and y_i the preceding RR interval.



Supplementary Figure 2. Graphic representation of an RR series, in which the abscissa is the number of each beat in the time series and the ordinate is the value of the RR interval in milliseconds.

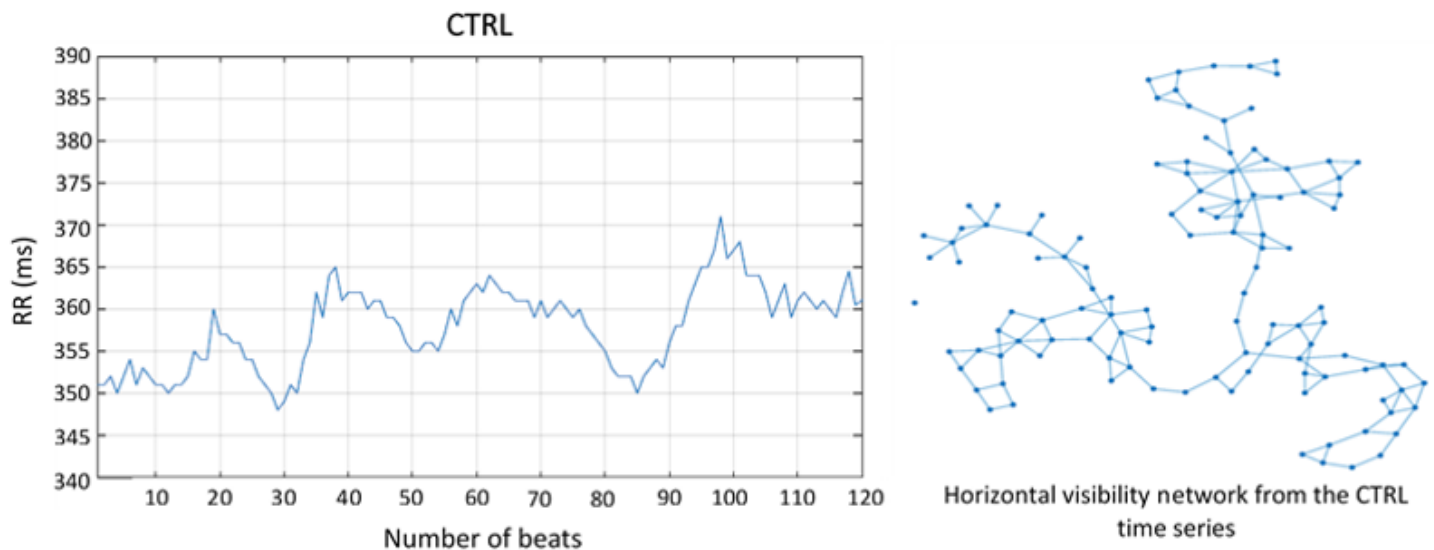
2. For simplicity, suppose that we take the excerpt in the box in Supplementary Figure 2, and convert the time-series values within this excerpt into an associated visibility graph that we consider as a landscape (Supplementary Figure 3). Two arbitrary data values of the time series (t_i, y_i) and (t_j, y_j) have visibility in this landscape if any other data (t_k, y_k) observed between them ($t_i < t_k < t_j$) fulfills the following visibility criterion:

$$\forall t_k \in [t_i, t_j]: y_i > y_k \text{ and } y_j > y_k$$



Supplementary Figure 3. Graphic horizontal visibility graph associated with the excerpt from Supplementary Figure 2.

3. Such analysis can be applied to the whole RR time series above using a 60-beat sliding window, for example. Hence, a network graph can finally be drawn to illustrate the overall visibility analysis (Supplementary Figure 4), in which every data point within the sliding window is transformed into a node and connected to visible nodes. In the present case, a link between two nodes is represented by a straight line (edge) in the whole time series.



Supplementary Figure 4. Horizontal-visibility network graph illustrating the horizontal visibility analysis of the whole time series depicted in Supplementary Figure 1. This time series was obtained after saline injection (control) in one lamb.

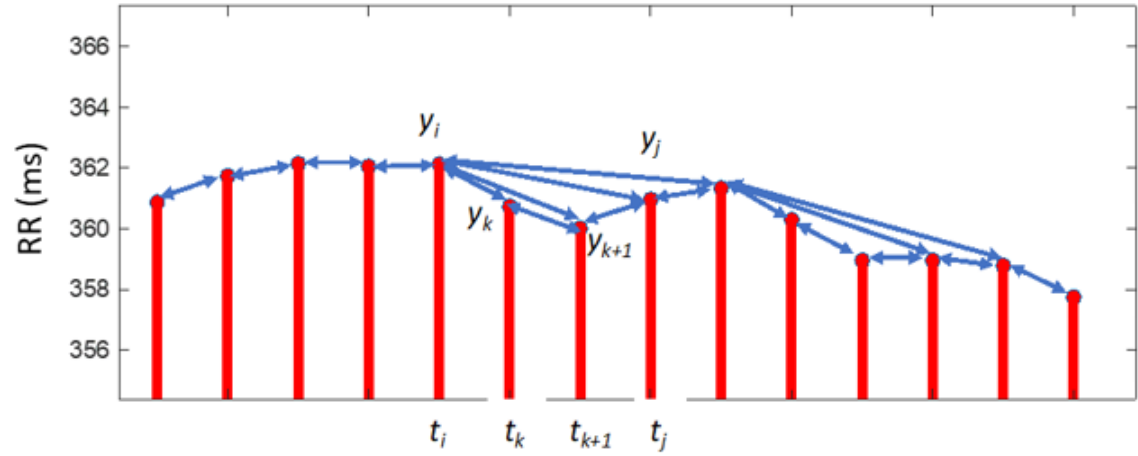
4. From this network graph, we can compute the number of nodes and the number of edges arriving at a node y_i , i.e. the degree of this node. We can also compute the number of triangles (= closed triplets) and the total number of (open and closed) triplets. Three measures can then be retained using graph theory to characterize the visibility network graph:

- The mean degree (H_MD) calculated on the entire graph. H_MD is a quantification of the network complexity. For example, in the present study the saline horizontal-visibility network graph is more complex than the LPS horizontal-visibility graph.
- The H-assortativity which is an indirect measure of the connectivity of nodes with the same degree. Assortativity provides information about the structure of the network.
- The H-transitivity which is the proportion of closed triangles among all possible triplets present in the graph. The H-transitivity quantifies the global connectivity within the network graph.

Vertical visibility analysis:

- 1- An analysis similar to the one used for the horizontal visibility network graph is applied to construct the vertical visibility network graph. Two arbitrary data values of the time series (t_i, y_i) and (t_j, y_j) are visible and will become connected nodes if any other data (t_k, y_k) observed between them ($t_i < t_k < t_j$) fulfills the following visibility criterion:

$$y_k < y_j + (y_i - y_j) \frac{t_j - t_k}{t_j - t_i}$$



Supplementary Figure 5. Vertical visibility graph associated with the excerpt from Supplementary Figure 2.

2- The rest of the analysis is similar to that described for the horizontal-visibility analysis.

Supplementary Table 1. PCR probes and primers (Invitrogen) used for the study of brainstem inflammation.

Gene Symbol	Ref-Seq	Dye-Label	Taqman Assay ID
SDHA	XM_027980212.1	FAM-MGB	Oa04307499_m1
CXCL8	NM_001009401.2	FAM-MGB	Oa04655586_m1
TNF-alpha	NM_001024860.1	FAM-MGB	Oa04656867_g1

CHAPITRE 3- DISCUSSION GÉNÉRALE

1.1. Modèle ovin pour l'étude des pathologies néonatales

L'ovin constitue le modèle de prédilection pour l'étude des pathologies néonatales de par ses caractéristiques intéressantes et ses similarités avec le nouveau-né humain. En effet, l'agneau est physiologiquement plus proche du nouveau-né humain que la plupart des autres modèles animaux existants (ex. rongeurs), ce qui en fait un modèle néonatal intéressant. Le développement fœtal au niveau cardiorespiratoire, la durée de gestation (environ 21 semaines ou 147 jours) et le poids à la naissance sont proches de l'humain (Jonker et al., 2007). La robustesse et la docilité des agneaux permettent une instrumentation chronique (ex. pose de cathéters) similaire, voire identique à ce qui est utilisé en clinique. La tranquillité des agneaux et l'absence de sédation et d'anesthésie nous permettent également de faire de longues polysomnographies plusieurs fois par semaine où des situations plus physiologiques ou physiopathologiques peuvent être mimées. De plus, une étude du laboratoire a confirmé que l'agneau néonatal est un modèle valide pour l'étude des RGO. En plus des similarités au niveau cardiorespiratoire, l'histologie œsophagienne et le fonctionnement des sphincters œsophagiens (SSO et SIO) sont comparables à celui des humains (activité tonique permanente et d'amplitude similaire à celle mesurée chez des nouveau-nés humains, ouverture lors du péristaltisme primaire et secondaire et présence de relaxations transitoires du SIO) (Djeddi et al., 2012).

Notre modèle d'agneau prématuré, quant à lui, est également un excellent modèle de prématuré humain. La naissance des agneaux prématurés est induite à 133 jours de vie comparée à 147 jours pour les agneaux à terme. Chez l'humain, ce stade de gestation est considéré comme une prématurité tardive représentant 30 à 32 semaines d'âge gestationnel. La prématurité tardive a été privilégiée dans notre étude puisque c'est le stade de maturation qui engendre le moins de mortalité à la naissance chez nos agneaux. L'agneau constitue donc un modèle de choix pour étudier les altérations cardiorespiratoires lors de pathologies néonatales fréquentes.

1.2. Discussion de l'article 1

L'originalité de cette étude repose sur la caractérisation complète des événements cardiorespiratoires réflexes lorsque des stimulations oesophagiennes sont réalisées chez un modèle ovin prématuré. Ce modèle tente de mimer, du mieux que possible, des RGO à différents niveaux de l'œsophage. De plus, l'étude contribue à de nouvelles connaissances sur les apnées-bradycardies réflexes qui sont possiblement incriminées dans les événements cardiorespiratoires du prématuré, sujet particulièrement controversé dans la littérature scientifique. Pour la première fois, à notre connaissance, la comparaison entre un modèle à terme et un modèle prématuré a été réalisée. Cet article comporte donc deux groupes d'agneaux, un groupe né à terme ($n = 8$) et un groupe prématuré ($n = 10$). Dans l'ensemble, nous avons montré que (1) les stimulations œsophagiennes engendrent des réflexes d'inhibition cardiorespiratoires (apnées, bradycardies, désaturations) chez l'agneau prématuré, (2) ces réflexes d'inhibition cardiorespiratoires sont cliniquement plus importants chez l'agneau prématuré que chez l'agneau à terme et (3) les doubles stimulations (stimulation simultanée de l'œsophage proximal et distal) induisent des réflexes cardiorespiratoires plus marqués que les simples stimulations (ex : stimulation de l'œsophage proximal uniquement).

Originalité du modèle ovin prématuré pour l'étude des RGO dans la littérature

Les réflexes émanant de l'œsophage sont considérés comme ayant des implications cliniques majeures. Néanmoins, alors que la responsabilité des CRL dans les manifestations cardiorespiratoires est bien acceptée (Jeffery et al., 1995; Thach, 2001; St-Hilaire et al., 2005; St-Hilaire et al., 2008), la contribution des RGO a été un sujet de débat important et a motivé de nombreuses recherches dans ce domaine (Praud, 2010; Poets et Brockmann, 2011; Abu Jawdeh et Martin, 2013). D'autant plus qu'il a été suggéré que les RGO peuvent potentiellement être impliqués dans certains cas de mort subite du nourrisson et de malaises sévères. À notre connaissance, notre étude est celle qui caractérise le plus

exhaustivement les événements cardiorespiratoires réflexes lorsqu'un RGO est mimé à différents niveaux de l'œsophage. De plus, le caractère unique et la complexité de notre étude sont renforcés par la comparaison de deux modèles à différents stades de gestation (naissance à terme vs. naissance prématurée).

Modèles animaux et humains de stimulations œsophagiennes entraînant des événements non cardiorespiratoires

Bien que certaines études physiologiques chez l'animal (adulte et nouveau-né) et chez l'humain (nouveau-né à terme et prématuré) aient montré que des réflexes peuvent provenir de la stimulation des mécano- et/ou chémorécepteurs œsophagiens, la majorité se sont principalement attardées aux altérations de la fonction œsophagienne (ex. réflexes péristaltiques, réflexe œsophago-laryngé, relaxation du SIO, contraction du SSO, déglutitions, relaxations transitoires du SIO) ou l'apparition de bronchoconstriction et la production de mucus (Tuchman et al., 1984; Shaker et al., 1994; Ishikawa et al., 1999; Lang et al., 2001; McKelvey et al., 2001; Jadcherla et al., 2003; Jadcherla, 2006; Jadcherla et al., 2006; Jadcherla et al., 2007; Lang et al., 2008; Lang et al., 2011; Jadcherla, 2012; Jadcherla et al., 2012; Lang et al., 2014; Lang et al., 2016). Ces études ont donc rapporté l'existence de réponses physiologiques de nature non cardiorespiratoire lors de stimulations œsophagiennes variées (distension lente ou rapide, injection d'air, d'eau, de jus de pomme ou de HCl).

Modèles animaux et humains de stimulations œsophagiennes entraînant des événements cardiorespiratoires

Les réponses de nature cardiorespiratoire à la stimulation œsophagienne ont principalement été étudiées en période néonatale dans quelques études seulement chez l'animal et l'humain. Deux études d'une même équipe de recherche réalisées chez des porcelets à terme (âgés d'environ 36 heures de vie) sous sédation et sans sédation en sommeil REM et/ou NREM ont mis en évidence la présence d'apnées *via* l'injection d'HCl à

trois différents sites de stimulation (pharynx, oesophage supérieur et oesophage inférieur). Le nombre d'apnées était toujours supérieur chez les porcelets sédatisés (Jeffery et al., 1995; McKelvey et al., 2001). Plus précisément, l'équipe de McKelvey et al., 2001 a montré, chez les porcelets sédatisés ($n = 8$), une même séquence de réponses à chacun des trois niveaux de stimulation; cette séquence associait déglutitions, apnées puis réaction d'éveil. En contrepartie, chez les porcelets non sédatisés ($n = 6$), cette séquence associait déglutitions, réaction d'éveil puis apnées. Seule la stimulation pharyngée a entraîné une augmentation significative des apnées chez les porcelets sédatisés comparativement aux porcelets sans sédation. Chez les porcelets sédatisés ($n = 5$), Jeffery et al., 1995 a également rapporté des apnées et des désaturations importantes lors d'une stimulation pharyngée (injection d'HCl). Ces dernières ont même mené à la mort de deux porcelets sédatisés, suggérant que certains cas de mort subite pourraient avoir une pathogenèse semblable (Jeffery et al., 1995). Au niveau cardiaque, chez 26 porcelets âgés de 2 à 15 jours (2 à 4 jours de vie; $n = 23$) sous anesthésie générale, l'injection d'acide dans l'œsophage a déclenché des ralentissements cardiaques (Kenigsberg et al., 1983). Dans le même ordre d'idées, une distension œsophagienne aiguë effectuée chez des chiots beagles (2 à 5 semaines de vie; $n = 6$) a montré qu'elle pouvait entraîner des réponses cardiaques variées telles que des arythmies (supraventriculaire ou ventriculaire allant jusqu'à la fibrillation ventriculaire) ou un collapsus cardiovasculaire (Schey et al., 1981a).

En dehors de la période néonatale, chez des rats adultes anesthésiés ou décérébrés, des distensions œsophagiennes nociceptives ont entraîné une augmentation de la pression artérielle systémique et de la fréquence cardiaque. Ces réponses réflexes semblent être médiées *via* des voies afférentes vagales (parasympathique) et spinales (sympathique) puisqu'une ablation des deux voies était nécessaire à l'abolition complète des réponses au niveau cardiovasculaire (Loomis et al., 1997; Pickering et al., 2002).

Chez l'humain, très rares sont les études qui ont regardé les réponses cardiorespiratoires réflexes lors de stimulations œsophagiennes expérimentalement induites en pédiatrie.

Seulement deux études du même auteur ont été effectuées chez des nourrissons (âge postnatal moyen de 31.2 jours) nés prématurés (âge gestationnel moyen de 35.5 semaines) en sommeil REM et en l'absence de sédation. Elles ont révélé une augmentation significative de l'intervalle RR (ralentissements cardiaques) en réponse à une distension de l'œsophage inférieur et une augmentation significative de la durée des cycles respiratoires (ralentissement de la fréquence respiratoire) lors d'une perfusion d'acide au niveau de l'œsophage inférieur (Ramet et al., 1990; Ramet, 1994).

Pour ce qui est des réponses cardiorespiratoires réflexes lors d'un reflux gastro-œsophagien physiologique, une relation causale a été démontrée dans quelques études seulement. D'abord, une association temporelle a été observée chez une population d'enfants considérés à terme mais qui sont nés prématurés (entre 24 et 29 semaines d'âge gestationnel) et ayant des événements cardiorespiratoires persistants à terme. En effet, cette relation a été établie entre des reflux et des apnées obstructives chez trois enfants en plus d'une relation avec des apnées mixtes et/ou centrales, des hypopnées et des désaturations chez au moins un enfant (Nunez et al., 2011). Une seconde étude chez des nouveau-nés prématurés (nés à environ 30 semaines de gestation) présentant des apnées récurrentes a noté 154/1136 apnées temporellement reliées aux épisodes de RGO (Corvaglia et al., 2009). Les auteurs ont observé que les apnées survenaient plus couramment à la suite d'un RGO qu'immédiatement avant la survenue d'un RGO ou sans RGO. Bien que certains croient cette association circonstancielle et liée à l'immatunité, les résultats suggèrent bel et bien une relation causale entre les apnées et les RGO. En effet, si les deux phénomènes n'étaient liés qu'à l'immatunité respiratoire des prématurés, il n'y aurait aucune différence dans la fréquence des apnées avant et après un RGO (Corvaglia et al., 2009). Dans une troisième étude effectuée chez des nouveau-nés, parmi une proportion de 364 RGO et de 165 apnées enregistrées, 49 apnées, soit 29,7 % étaient reliées aux RGO, reflétant ainsi une association significative entre les épisodes apnéiques et les RGO (Wenzl et al., 2011). De plus, chez des nouveau-nés prématurés (âge gestationnel moyen de 34.6

semaines) en unité de soins intensifs néonataux présentant certaines pathologies (ex. apnées-bradycardies, désaturations), 6 % et 26 % des manifestations pour la plupart d'ordre cardiorespiratoire (toux, bâillements, étouffements, stridor, apnées, hypopnées, respiration périodique, bradycardies et désaturations) ont été corrélées à des RGO survenant respectivement durant le sommeil et à l'éveil (Qureshi et al., 2015). Finalement, une étude prospective menée entre 2012 et 2016 chez des nouveau-nés prématurés (ayant des RGO et des manifestations cardiorespiratoires récurrentes) s'est plutôt intéressée à la relation entre les désaturations et les bradycardies durant un RGO. Leurs résultats ont montré que parmi les 4936 événements cardiorespiratoires (4710 désaturations et 226 bradycardies) survenus lors des 3341 RGO, 609 d'entre eux, soit 12 %, y étaient temporellement associés (Nobile et al., 2019).

Bien qu'une relation temporelle entre les réflexes émanant de l'œsophage et des événements cardiorespiratoires se soit avérée positive dans certaines études, il persiste un manque d'information dans la littérature, surtout en période néonatale. De plus, plusieurs études rejettent cette hypothèse et entretiennent une controverse (Peter et al., 2002; Di Fiore et al., 2005; Mousa et al., 2005; Slocum et al., 2009; Di Fiore et al., 2010; Funderburk et al., 2016; Cresi et al., 2018). Les preuves de cette relation temporelle sont, en grande partie, circonstanciées pour certains puisque les apnées se produisent fréquemment en postprandiale (Vandenplas *et al.*, 2009; Poets et Brockmann, 2011; Jawdeh et Martin, 2013) et que le mécanisme possible serait *via* l'activation de chémoréflexes laryngés. De plus, cette association semble difficile à maintenir pour certains puisque la méthode actuellement utilisée pour détecter un RGO est l'impédance pH-métrie œsophagienne qui ne permet que la détection des RGO acides ($\text{pH} < 4$), alors que la majorité des reflux chez les nourrissons sont faiblement acides (lait tamponne l'acidité gastrique).

Notre modèle, pour sa part, se démarque des autres puisqu'il permet de caractériser de façon plus exhaustive ces réflexes à point de départ œsophagien *via* l'enregistrement de

multiples variables cardiorespiratoires chez un modèle ovin né à terme et prématuré, en l'absence de sédation, mimant ainsi une situation physiologique se rapprochant le plus possible d'un contexte clinique.

Connaissances nouvelles révélées par notre modèle ovin prématuré pour l'étude des RGO

Les résultats de la présente étude sur les réflexes à point de départ œsophagien rappellent nos observations antérieures sur les chémoréflexes laryngés chez notre modèle d'agneau à terme et prématuré (St-Hilaire et al., 2005; St-Hilaire et al., 2007).

Les RGO sont un phénomène physiologique fréquent chez les nourrissons qui peuvent contribuer à déclencher diverses manifestations cardiorespiratoires et des mécanismes de protection des voies aériennes supérieures. Nos données expérimentales confirment notre hypothèse de départ : la stimulation œsophagienne, lorsqu'un RGO est mimé, entraîne des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs qui sont amplifiés par la naissance prématurée chez l'ovin, suggérant un rôle important de la maturation postnatale. Il est connu que les prématurés sont plus vulnérables en raison d'une immaturité globale au niveau anatomique et physiologique. Entre autres, l'immaturité des poumons (défaut d'alvéolarisation), des muscles respiratoires et du système de contrôle respiratoire contribue à une ventilation altérée du prématuré (Di Fiore et al., 2016; McDonald et al., 2019). L'immaturité des centres cardiorespiratoires du tronc cérébral (Di Fiore et al., 2016), possiblement avec une sensibilité accrue des récepteurs œsophagiens, est probablement impliquée dans les réponses inhibitrices exacerbées chez les agneaux prématurés (Schey et al., 1981b).

La naissance prématurée accroît les réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs

Dans l'ensemble, nos résultats révèlent que la stimulation des récepteurs œsophagiens entraîne une inhibition cardiaque et respiratoire accrue chez les agneaux prématurés comparés aux agneaux à terme. Nous avons observé la présence d'apnées, de bradycardies

et de désaturations en oxygène cliniquement significatives pouvant menacer le pronostic vital, dans certains cas, chez notre modèle prématuré. En effet, le nombre (distension inférieure et injection supérieure d'HCl simultanément) et la durée des apnées (injection supérieure et inférieure d'HCl simultanément) ont été significativement augmentés en plus du nombre de ralentissements cardiaques (distension inférieure) et du pourcentage de diminution de la fréquence cardiaque (distension inférieure et injection d'HCl inférieure séparément). Cette inhibition cardiorespiratoire amplifiée peut suggérer une immaturité du contrôle cardiorespiratoire, une hypersensibilité des récepteurs oesophagiens (qui sont plus immatures) ou une conduction accrue des afférences ou des efférences au niveau des fibres nerveuses du vague (Schey et al., 1981b; Di Fiore et al., 2016). En d'autres termes, l'immaturité de l'arc réflexe se traduit par des réponses de type vagal chez les agneaux prématurés. Ces observations vont de pair avec les études de Ramet et al., publiées en 1990 et 1994 qui ont mis en évidence des ralentissements cardiaques et respiratoires lors de l'induction d'une distension ou une perfusion d'acide dans l'œsophage inférieur chez des nouveau-nés en santé. De plus, nos observations sont cohérentes avec les études de Jeffery et al., 1995 et McKelvey et al., 2001 chez des porcelets à terme sous sédation, qui ont révélé la présence d'apnées via l'injection d'acide au niveau de l'œsophage supérieur et inférieur.

La naissance prématurée réduit les réflexes de protection des voies respiratoires

Mis à part les événements cardiorespiratoires, nos résultats démontrent également l'induction de mécanismes de protection des voies respiratoires (déglutitions, fermeture laryngée, toux et réaction d'éveil) tels que précédemment décrits pour les chémoréflexes laryngés chez les agneaux prématurés (St-Hilaire et al., 2005). Ces observations concordent avec celles chez les porcelets (avec ou sans sédation) où des stimulations œsophagiennes entraînent des déglutitions et une réaction d'éveil (Jeffery et al., 1995; McKelvey et al., 2001). Toutefois, une diminution significative du réflexe de toux est observée lors d'une distension supérieure de l'œsophage chez les agneaux prématurés comparés aux agneaux à terme. De plus, bien que non significativement différents, la plupart des mécanismes de

protection sont réduits chez les agneaux prématurés. Cette situation renforce l'hypothèse selon laquelle la naissance prématurée exacerbe les réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs et réduit les réflexes protecteurs des voies aériennes supérieures. Il n'est pas surprenant d'observer une réduction des mécanismes de protection chez les agneaux prématurés, étant donné qu'au fur et à mesure que la maturation progresse, on observe une augmentation des réflexes protecteurs tels que la toux et des apnées moins prononcées comme observées chez les agneaux à terme (Thach et al., 2001). Enfin, une augmentation de la pression artérielle systémique moyenne a été observée chez les agneaux prématurés en raison de l'activation du système sympathique (réponse de défense contre la composante vagale). Or, la stimulation œsophagienne semble être responsable, tout comme les CRL, d'une activation simultanée du système sympathique et parasympathique (coactivation sympathovagale), qui est sensible à une maturation physiologique (St-Hilaire et al., 2005; Beuchee et al., 2007; St-Hilaire et al., 2007). Tel que démontré dans notre étude par une inhibition cardiorespiratoire accrue, la composante vagale (apnée, bradycardie) prédomine sur la composante sympathique chez les agneaux prématurés. L'inverse est aussi vrai chez les agneaux à terme, c'est-à-dire une prédominance de la composante sympathique sur la composante vagale due à une maturation accrue (Loomis et al., 1997; Pickering et al., 2002).

Conséquences du type et de l'emplacement des stimulations œsophagiennes sur la gravité des événements cardiorespiratoires chez l'agneau prématuré

Dans la littérature, un débat important sur la possibilité qu'un RGO puisse mener à d'importants événements cardiorespiratoires perdure. Il est bien accepté qu'un reflux laryngopharyngé stimulant les récepteurs laryngés peut contribuer à expliquer l'association entre RGO et événement cardiorespiratoire, par l'intermédiaire de chémoréflexes laryngés. Néanmoins, notre étude démontre, pour la première fois, qu'un reflux proximal (injection d'acide dans la portion supérieure) n'est pas le seul élément déclencheur d'événements

cardiorespiratoires inhibiteurs et renforce l'hypothèse qu'une stimulation restreinte à l'œsophage peut engendrer des effets à partir de différents niveaux (distension et/ou injection HCl), sans pénétration laryngée où des CRL peuvent majorer l'inhibition cardiorespiratoire. D'ailleurs, cette non-pénétration laryngée a été confirmée chez trois agneaux lors d'une injection supérieure de bleu de méthylène et chez trois agneaux supplémentaires *via* vidéofluoroscopie lors de l'injection supérieure d'acide, laissant ainsi cette possibilité peu probable. De plus, l'observation selon laquelle une distension exclusivement limitée à la portion supérieure ou inférieure de l'œsophage peut engendrer une apnée et des ralentissements cardiaques chez l'agneau prématuré constitue une preuve irréfutable qu'une stimulation restreinte à l'œsophage peut aussi induire des réflexes cardiorespiratoires cliniquement importants.

Les doubles stimulations œsophagiennes induisent une inhibition cardiorespiratoire plus marquée que les simples stimulations chez l'agneau prématuré

De toute évidence, tel qu'observé chez nos agneaux à terme, l'inhibition cardiorespiratoire la plus puissante survient lors des doubles stimulations œsophagiennes (stimulation simultanée de l'œsophage proximal et distal) chez les agneaux prématurés. L'étude de Ramet (1994) a également observé cette situation lors d'une double stimulation (distension et perfusion de HCl simultanée) qui a provoqué des réponses cardiaques plus importantes que durant chaque stimulation distincte. L'hypothèse est que ce phénomène pourrait être lié à l'effet sommatif de la stimulation simultanée de l'œsophage distal et proximal qui amplifie la réponse (stimulation de l'œsophage entier). De plus, des résultats chez l'homme adulte suggèrent une sensibilité accrue de la portion supérieure de l'œsophage à la stimulation mécanique et chimique comparativement à la portion inférieure (Weusten et al., 1995; Woodland et al., 2015). Cette différence de sensibilité semble être la conséquence d'une innervation différente entre les parties proximale et distale. Entre autres, les nerfs afférents de la muqueuse proximale seraient plus superficiels et donc plus sensibles aux stimulations, ce qui expliquerait aussi, en partie, les mécanismes de protection des voies

aériennes supérieures (Woodland et al., 2015). De plus, une autre hypothèse de cette sensibilité accrue de la portion supérieure de l'œsophage pourrait être liée à la différence dans la densité des récepteurs œsophagiens (TRP et ASIC). En effet, il est possible que la partie proximale de l'œsophage contienne une densité accrue de récepteurs comparativement à la partie distale. Cependant, bien que nos résultats ne soient pas contradictoires, ils ne fournissent aucune preuve à l'appui suggérant une sensibilité accrue de la partie proximale par rapport à la partie distale de l'œsophage.

Limites de l'étude

L'objectif principal de la présente étude était de caractériser et comparer les altérations cardiorespiratoires lorsqu'un RGO est mimé chez l'agneau né à terme et prématuré. Bien que notre modèle ovin prématuré pour l'étude des RGO soit unique, il comporte toutefois certaines limites. Tout d'abord, les expérimentations ont été réalisées uniquement en période de sommeil NREM alors qu'il a été démontré que les événements cardiorespiratoires inhibiteurs sont plus fréquemment reliés au RGO durant la période d'éveil chez les nourrissons prématurés (Qureshi et al., 2015). De plus, puisque chez le nouveau-né humain la majorité des reflux sont faiblement acides, il serait pertinent d'évaluer les effets d'une stimulation lorsqu'un reflux faiblement acide (pH entre 4 et 7) est mimé chez l'agneau prématuré (Salvatore et al., 2010). Bien que la non-pénétration laryngée ait été confirmée (*via* vidéofluoroscopie et injection de bleu de méthylène) et que nous avons montré qu'une distension limitée à l'œsophage supérieur peut engendrer des apnées, il faut tout de même rester prudent quant à la conclusion bien qu'il soit très peu probable que des événements cardiorespiratoires aient pu être majorés par l'effet de CRL. De plus, bien que nous ayons choisi cinq types de stimulations œsophagiennes que nous trouvons pertinentes, nous sommes conscients que plusieurs autres choix de stimulation auraient pu être faits dans cette étude afin de mimer un RGO. Enfin, il y a une grande variabilité interindividuelle chez nos agneaux, ce qui entraîne une plus grande difficulté dans l'interprétation des résultats.

Conclusion

Notre étude confirme, pour la première fois, qu'une stimulation œsophagienne entraîne des événements cardiorespiratoires inhibiteurs chez les agneaux, qui sont cliniquement plus importants chez les agneaux prématurés (apnées, bradycardies, désaturations), probablement en raison d'une immaturité accrue du système nerveux central. Ces événements cardiorespiratoires sont possiblement impliqués dans certains cas de malaise sévère et de mort subite du nourrisson. Les reflux gastro-œsophagiens pourraient donc être considérés en tant que facteur de risque du SMSN.

En pratique, le traitement du RGO débute par la modification de la prise alimentaire (ex. alimentation plus fréquente mais de moins grande quantité, épaississement des aliments) et du positionnement après l'alimentation (position en proclive). Toutefois, certains nourrissons ont besoin de médicaments antiacides tels que les inhibiteurs de la pompe à protons et les anti-H2. Ces médicaments ont la propriété de neutraliser l'acidité gastrique. Nos résultats suggèrent que tous ces traitements peuvent, en limitant la stimulation (acide et/ou distension) de l'œsophage, diminuer les événements cardiorespiratoires à point de départ œsophagien. L'utilisation de médicaments antiacides, en particulier les inhibiteurs de la pompe à protons, n'est cependant pas dénuée d'effets secondaires et elle doit donc être raisonnée. Ainsi, il est de plus en plus recommandé par les experts d'effectuer une impédance pH-métrie œsophagienne dans les cas d'événements cardiorespiratoires reliés à des reflux gastro-œsophagiens, de façon à décider si un médicament antiacide est justifié.

1.3. Discussion de l'article 2

L'originalité de cette étude repose sur la mise au point d'un modèle ovin néonatal d'inflammation systémique induite par l'injection de lipopolysaccharides de *E.Coli*. Notre étude est particulièrement intéressante puisqu'elle étudie tous les aspects physiologiques et cliniques. En effet, elle contribue à l'avancement de nouvelles connaissances sur les altérations physiologiques et leur dynamique au cours des 6 premières heures suite à l'induction de l'inflammation systémique chez des agneaux à terme et en santé. Ce modèle tente de mimer, du mieux possible, l'inflammation systémique qui accompagne un sepsis d'apparition tardive, une pathologie fréquemment rencontrée en unité de soins intensifs néonataux. Dans l'ensemble, les résultats révèlent que l'injection de LPS a entraîné (1) des symptômes cliniques (diminution de l'activité locomotrice et de l'éveil agité, diarrhée et augmentation biphasique de la température corporelle), (2) des altérations cardiorespiratoires (augmentation biphasique des fréquences respiratoire et cardiaque et augmentation du nombre de ralentissements cardiaques), (3) une diminution de la variabilité cardiaque et respiratoire, (4) aucune altération de la réflexivité du système nerveux autonome lors de la stimulation des chémoréflexes laryngés et pulmonaires chez un second groupe d'animaux et (5) une augmentation des marqueurs précoces d'inflammation (IL-8 et TNF- α) et une activation des cellules microgliales au niveau du tronc cérébral.

Cette étude est intéressante puisqu'elle participe à l'élaboration de stratégies permettant une meilleure détection et prise en charge du LOS. Le taux substantiel de mortalité et de morbidité en lien avec le sepsis néonatal nous a amenés à nous intéresser à la façon dont il serait possible d'améliorer le diagnostic précoce des nourrissons, en particulier des prématurés (étude à venir). Les manifestations cliniques et cardiorespiratoires obtenues dans cette étude pourraient servir de pistes d'investigation des nourrissons atteints d'un sepsis bactérien afin d'éviter les complications potentiellement dangereuses. C'est une étude très complète qui a nécessité beaucoup de collaborations externes.

Originalité du modèle d'inflammation systémique dans la littérature

Notre modèle est unique et pertinent puisque seulement quelques études d'inflammation systémique *via* l'injection de LPS de *E.Coli* chez des modèles ovin néonatal (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005; Hamilton et al., 2006; Feng et al., 2010), juvéniles, communément appelés broutards (4 à 5 mois de vie) (Liang et al., 2019) et adultes (Ferrara et al., 2019) ont été rapportées dans la littérature à ce jour. À l'exception de l'étude de Billiards et al., 2002 mentionnant une augmentation marquée des fréquences cardiaque et respiratoire (résultats numériques non présentés dans la publication), les autres études chez l'agneau nouveau-né ne se sont pas particulièrement intéressées aux altérations cardiorespiratoires lors de l'injection de LPS, l'objectif principal n'étant pas de mimer l'inflammation systémique observée lors d'un sepsis bactérien. Chez les agneaux juvéniles, des injections de LPS ont été réalisées à différentes concentrations (0.25, 1.25 et 2.5 µg/kg) durant les jours 1, 3, 5, 7 et 9 dans le but de mimer une réponse inflammatoire chronique (Liang et al., 2019). Bien que les chercheurs aient mentionné une augmentation de la fréquence respiratoire 60 minutes suite à l'injection de LPS aux jours 1 et 3 pour les doses de 1.25 et 2.5 µg/kg seulement, aucun résultat n'a été présenté dans l'article. De plus, ils ont rapporté que la FC a significativement augmenté par rapport au groupe contrôle suite à l'injection de 2.5 µg/kg de LPS pour tous les jours (Liang et al., 2019). Chez les moutons adultes, une diminution de la FC, de la pression artérielle systémique et de l'index cardiaque a été observée 60 minutes suite à l'injection de LPS (Ferrara et al., 2019).

En plus des modèles chez l'ovin, une inflammation systémique reliée à l'injection de LPS a été induite chez des rats nouveau-nés (Olsson et al., 2003; McDonald et al., 2016a,b), des souriceaux (Mukherjee et al., 2010), des porcelets (McDeigan et al., 2003), des chèvres adultes (Takeuchi et al., 1997) et des chèvres nouveau-nés (Salvesen et al., 2017). Bien que certaines de ces études aient noté des observations au niveau cardiorespiratoire, elles demeurent tout de même très limitées. Tout d'abord, du côté respiratoire, l'équipe de

Olsson et al., 2003 a observé une tendance à la baisse de la f_R en condition de LPS chez les rats. Toutefois, chez les porcelets et d'autres rats nouveau-nés, l'injection de LPS n'a pas entraîné de modification des variables respiratoires (McDeigan et al., 2003; McDonald et al., 2016a,b) en normoxie. Du côté cardiaque, une augmentation de la FC et une altération de la performance cardiaque ont été observées chez des souris (Mukherjee et al., 2010). Puis, chez les chèvres adultes, une tendance à l'augmentation de la FC a été notée durant les 210 premières minutes post injection de LPS (Takeuchi et al., 1997) ce qui va dans le même sens qu'une augmentation significative de la FC à une température ambiante supérieure (38 °C) chez des rats (McDonald et al., 2016b).

Dans l'ensemble, les altérations cardiorespiratoires décrites dans les études antérieures sont particulièrement limitées et très variées. La grande variation des résultats d'une étude à l'autre pourrait être liée à la dose de LPS utilisée, la voie d'administration, l'âge des animaux, les différences interespèces et aux conditions expérimentales (ex. température ambiante, hypoxie). Notre modèle, pour sa part, permet l'étude des altérations cardiorespiratoires en normoxie et à une température ambiante neutre afin de mimer, du mieux que possible, l'inflammation systémique qui survient durant les premières heures d'un sepsis bactérien néonatal.

Connaissances nouvelles révélées par notre modèle ovin d'inflammation systémique induite par le LPS

Le LPS de *E. Coli* a été utilisé chez notre modèle d'agneau né à terme et en santé afin de mimer une inflammation systémique se rapprochant de celle induite, dès les premières heures, lors d'un sepsis bactérien d'apparition tardive. L'utilisation du LPS, au détriment de bactéries vivantes, présente des avantages tels que la sécurité, la reproductibilité, l'homogénéité de la réponse et le contrôle de la dose administrée. Le choix de la dose de LPS utilisée a, d'abord, été validé en fonction des données de la littérature chez les ovins néonataux (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005; Hamilton et al., 2006; Feng et al., 2010)

et juvéniles (Liang et al., 2019). Dans ces études, les doses injectées en bolus ou *via* perfusion variaient de 200 ng/kg à 3 µg/kg chez les agneaux. Or, basé sur la littérature existante et notre étude pilote de titration, la dose de 2.5 µg/kg de LPS en bolus a été sélectionnée. Nous avons choisi la dose minimale pour laquelle l'inflammation systémique engendrait des manifestations cliniques et des altérations cardiorespiratoires dans les premières heures suivant l'injection de LPS, le but n'étant pas de causer un choc septique (Shane et al., 2017). Notre étude est unique puisqu'elle permet de caractériser en détail les manifestations cliniques et les altérations cardiorespiratoires lors d'un sepsis bactérien chez l'agneau néonatal qui est reconnu en tant qu'excellent modèle du nouveau-né humain. D'ailleurs, nos observations révèlent que les manifestations physiologiques surviennent dès la première heure suivant l'injection de LPS.

Conséquences de l'injection de LPS sur les manifestations cliniques des agneaux à terme

Les résultats chez l'agneau à terme ont montré une augmentation biphasique de la température rectale et une diminution de l'activité locomotrice et de l'éveil agité. Ces données sont intéressantes puisque très peu d'information existe à ce jour sur les manifestations cliniques induites par l'injection de LPS chez les animaux nouveau-nés.

Augmentation biphasique de la température corporelle

L'injection de LPS a induit une augmentation biphasique de la température rectale, phénomène également observé chez la plupart des modèles animaux (Roth et Blatteis, 2014), incluant des agneaux (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005) et des chevreux (Salvesen et al., 2017). La pathogenèse de cette fièvre biphasique est un processus très complexe et fait intervenir une cascade inflammatoire. En premier lieu, l'injection systémique de LPS induit l'activation des TLR4 (présents, entre autres, sur les macrophages et certaines microglies du SNC) et de la cascade du complément, ce qui entraîne la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α (*via* l'activation de la voie NF κ B) et de

la PGE_2 (*via* l'action de $IL-1\beta$ et de la cyclooxygénase-2). Quant à eux, les macrophages du foie (cellules de Küpffer) produisent également ces cytokines pro-inflammatoires. Par la suite, la réaction inflammatoire périphérique systémique (*via* PGE_2) est acheminé aux neurones préoptiques de l'hypothalamus où il y aura augmentation de la température du thermostat hypothalamique (réaction inflammatoire centrale) *via* une voie afférente vagale et humorale (Roth et Blatteis, 2014; McDonald et al., 2017). L'hypothèse est que la voie vagale implique des médiateurs inflammatoires qui vont agir localement au niveau du foie et en périphérie sur les récepteurs vagues afin de transmettre des messages afférents au cerveau par le nerf vague. La voie humorale fait intervenir des molécules dans le sang qui vont atteindre le cerveau, soit *via* la barrière hémato-encéphalique inflammée (donc plus perméable) ou les organes circumventriculaires, expliquant, en partie, les phases fébriles précoce et tardive que l'on observe. Dans la littérature, il est décrit que, durant la phase précoce, il y a une augmentation rapide de la température, suivie d'une brève diminution; s'ensuit la phase tardive où l'augmentation de la température est plus prolongée et se maintient en plateau (Roth et Blatteis, 2014). La fièvre est une réponse immunitaire physiologique adaptative mise en œuvre lors d'une infection et permet d'accroître le métabolisme et la guérison en plus de freiner la croissance bactérienne ce qui semble être une réponse inflammatoire centrale appropriée aux LPS chez nos agneaux (Blomqvist et Engblom, 2018). Bien qu'une fièvre modérée soit l'un des signes cliniques chez les nouveau-nés atteints de sepsis (Kerste et al., 2016; Wu et al., 2017), l'hypothermie est également fréquemment rencontrée lors d'un sepsis néonatal, ce qui expliquerait la chute de température observée chez l'un de nos agneaux (Bekhof et al., 2013). Il est à noter, cependant, que les mécanismes de l'hypothermie ne sont pas bien connus à ce jour. L'hypothèse est que, bien que la libération de la PGE_2 induise une augmentation de la température du thermostat hypothalamique, le $TNF-\alpha$, quant à lui, *via* une cascade inflammatoire inconnue, semble induire une diminution de la température hypothalamique lors de certaines situations, limitant probablement, ainsi, une partie de la réponse fébrile. Le $TNF-\alpha$ pourrait avoir un effet antipyrétique selon les espèces, le type et la gravité du

stimulus inflammatoire (Leon, 2004). L'hypothermie, tout comme l'hyperthermie, est une réponse physiologique pouvant être bénéfique lors d'une infection afin de limiter la demande métabolique et de prévenir l'épuisement énergétique (Leon, 2004). De plus, selon une hypothèse basée sur des études animales, la fièvre serait bénéfique pour combattre une infection ou une inflammation systémique modérée alors que l'hypothermie serait bénéfique pour combattre une infection ou une inflammation systémique sévère (Garami et al., 2018). Toutefois, il est important de noter que l'inflammation systémique chez l'agneau présentant une hypothermie ne semblait pas plus sévère que celle des autres agneaux au sens où les manifestations cliniques et les altérations cardiorespiratoires n'ont pas été aggravées chez cet agneau. Il est donc impossible de fournir une hypothèse exacte expliquant la différence entre cet agneau et les sept autres agneaux.

Diminution de l'activité locomotrice et de l'éveil agité

Nous avons observé que les agneaux en condition LPS semblaient beaucoup plus léthargiques et amorphes qu'en condition contrôle, ils se nourrissaient moins au biberon et ils étaient plus calmes. De plus, la grande majorité des agneaux avaient de la diarrhée les heures suivant l'injection de LPS. En effet, l'étude de l'activité locomotrice est concordante avec nos observations cliniques. La distance totale parcourue par nos agneaux à l'intérieur du caisson était significativement diminuée durant les 6 heures d'enregistrement avec une diminution plus importante aux heures 2, 3 et 4. Puisque chaque injection de salin ou de LPS a été réalisée à la même heure tous les matins, aucun biais n'a pu être causé par le cycle physiologique de sommeil-éveil des agneaux tant en condition contrôle qu'en condition LPS. Cette diminution de l'activité locomotrice a également été décrite dans la littérature suite à l'injection de LPS (Roth et Blatteis, 2014). L'hypothèse derrière cette diminution de l'activité locomotrice serait l'implication de cytokines pro-inflammatoires. En effet, durant le sepsis, une réponse comportementale caractérisée par une somnolence, une perte d'appétit et une diminution de l'activité serait induite par l'action des cytokines pro-inflammatoires au niveau du cerveau (Norheim et al., 2011).

Dans le même ordre d'idées, l'injection de LPS a entraîné une altération des stades de conscience. Bien que l'augmentation du sommeil NREM n'ait pas atteint la significativité, l'éveil calme a été augmenté aux dépens de l'éveil agité chez nos agneaux en condition LPS. Ces observations sont concordantes avec une étude chez l'agneau qui a montré une augmentation de la somnolence et du sommeil NREM suite à l'injection de LPS (Billiards et al., 2002) et chez les rongeurs et les lapins qui a également montré une augmentation du sommeil NREM (Mullington et al., 2000). Chez l'homme adulte, l'altération des stades de sommeil dépendait de la dose d'endotoxine, le sommeil NREM était diminué à forte dose mais augmenté à faible dose (Mullington et al., 2000). En effet, de nombreuses recherches ont établi l'implication de cytokines dans la régulation du sommeil, en particulier au cours d'une infection. Entre autres, IL-1 β et TNF- α ont un rôle somnogénique et peuvent réguler le sommeil NREM (Kapsimalis et al., 2005; Zielinski et Krueger, 2011). Ces médiateurs inflammatoires vont agir au niveau des circuits neuronaux du sommeil et des centres régulateurs du sommeil (zone préoptique hypothalamique et cerveau antérieur basal) (Zielinski et Krueger, 2011; Krueger et Opp, 2016). Les cytokines systémiques affectent la fonction cérébrale de deux façons : (1) soit directement *via* des messages afférents vagues (liaison des cytokines sur les récepteurs vagues) qui vont induire une libération de cytokines dans le cerveau par la glie et les neurones et (2) soit indirectement en étant transportées à travers la barrière hémato-encéphalique pour induire leur propre synthèse et celle d'autres cytokines (Kapsimalis et al., 2005; Krueger et Opp, 2016).

Nos résultats sur l'activité locomotrice et les stades de conscience vont de pair avec les symptômes d'infection (ex. léthargie, hypotonie) qui peuvent être présents chez les nouveau-nés suggérant que notre modèle ovin d'inflammation systémique mime bien les premiers signes de sepsis retrouvés en clinique (Shane et al., 2017).

Conséquences de l'injection de LPS sur les altérations cardiorespiratoires

Les résultats ont montré une augmentation biphasique des fréquences respiratoire et cardiaque en plus d'une diminution de la VRC et de la VRF. Ces altérations du contrôle cardiorespiratoire sont particulièrement pertinentes puisque la tachypnée, la tachycardie et les altérations de la VFC sont des signes courants d'un sepsis à apparition précoce et d'un sepsis à apparition tardive retrouvés chez les nouveau-nés (Griffin et al., 2005; Beuchee et al., 2009; Fairchild, 2013; Bohanon et al., 2015; Kerste et al., 2016; Nguyen et al., 2017; Wu et al., 2017).

Augmentation de la fréquence respiratoire et diminution de la VFR

La f_R a significativement augmenté (prolongation de la durée des cycles respiratoires) durant les 6 heures d'enregistrement chez les agneaux suite à l'injection de LPS. De plus, l'augmentation biphasique de la f_R reproduit grossièrement l'augmentation biphasique de la température corporelle. L'augmentation de la f_R était également associée à une diminution significative de la VFR (diminution de la variabilité à court et à long terme). Il est difficile d'établir le mécanisme en cause dans cette légère tachypnée, par ailleurs ce phénomène peut être attribuable à de multiples causes qui restent, tout de même, très hypothétiques. Tout d'abord, une possibilité pouvant expliquer cette augmentation de la f_R serait l'effet direct de l'injection de LPS sur les poumons. Plus précisément, si l'on suit la route d'administration du LPS à partir du moment où il a été injecté au niveau de la veine jugulaire, en passant par la veine cave supérieure, l'oreillette droite, le ventricule droit et, finalement, l'artère pulmonaire, le LPS pourrait atteindre directement les poumons et causer une légère lésion pulmonaire aigüe responsable, en partie, de cette tachypnée (Wang et al., 2008). Une deuxième hypothèse serait l'effet des médiateurs inflammatoires (inconnus) au niveau des centres de contrôle respiratoire. Or, les médiateurs inflammatoires pourraient atteindre les centres respiratoires et être responsables de l'augmentation de la f_R soit en étant transportés de façon active à travers la barrière

hémato-encéphalique, soit en pénétrant à travers les organes circumventriculaires par exemple. Parmi ces médiateurs inflammatoires, la PGE_2 est difficile à incriminer puisqu'elle semble plutôt inhiber l'activité respiratoire par sa liaison sur les récepteurs EP3 situés, entre autres, au niveau du NTS et de la substance réticulée bulbaire ventrolatérale (RVLM) du tronc cérébral (Hofstetter et al., 2007; Siljehav et al., 2015). Finalement, une troisième hypothèse serait possiblement l'effet de la fièvre chez les agneaux due à augmentation biphasique de la f_R qui est en phase avec celle de la température. Bien qu'une légère tachypnée soit observée chez nos agneaux, des observations hétérogènes ont été obtenues chez d'autres modèles animaux. Aucun changement significatif de l'activité respiratoire n'a été observé chez les rats nouveau-nés (Olsson et al., 2003; McDonald et al., 2016a,b) et les porcelets (McDeigan et al., 2003) suite à l'injection de LPS. Les différences entre les études pourraient résulter des diversités dans les méthodes (ex. dose de LPS) et les modèles utilisés (ex. espèces et âge).

Augmentation de la fréquence cardiaque et diminution de la VFC

L'injection de LPS a augmenté significativement la FC et le nombre de ralentissements cardiaques par rapport à la condition contrôle. Par ailleurs, bien que l'augmentation de la FC soit également biphasique, les deux phases sont clairement retardées par rapport à la courbe de la f_R et celle de la température. De plus, contrairement à l'augmentation de la f_R , l'augmentation de la FC a aussi été observée chez des modèles murins (Mukherjee et al., 2010; McDonald et al., 2016a,b). Dans le but d'émettre des hypothèses mécanistiques expliquant cette tachycardie, il faut savoir que la littérature a montré que les médiateurs inflammatoires peuvent stimuler les systèmes sympathique et parasympathique en fonction du contexte. Dans le contexte de l'augmentation de la FC, les connaissances actuelles suggèrent que des médiateurs inflammatoires (ex. IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α) (Kenney et Ganta, 2014; Badke et al., 2018) peuvent avoir un effet sympathoexcitateur au niveau des centres de contrôle cardiaque du tronc cérébral soit en étant transportés à travers la barrière hémato-encéphalique, soit en pénétrant à travers les organes circumventriculaires,

entre autres. Par contre, on sait aussi que les médiateurs inflammatoires peuvent avoir un effet parasympathique et donc expliquer l'augmentation des décélérations cardiaques qui rappellent les bradycardies fréquemment observées lors d'infections néonatales (Beuchée et al., 2009). Dans le contexte de l'augmentation des ralentissements cardiaques, ce phénomène pourrait, en partie, être attribuable à l'effet central de la PGE_2 qui, une fois liée à ces récepteurs EP3 présents à de nombreux sites dans le système nerveux central, pourrait induire des altérations cardiaques (Kenney et Ganta, 2014). En effet, une étude chez des fœtus de brebis a montré une diminution de la FC lors de la perfusion de PGE_2 (Savich et al., 1995). Cependant, nous n'avons trouvé aucune preuve d'une activité parasympathique accrue lors de l'analyse de la VFC afin d'expliquer les décélérations cardiaques.

Finalement, il semble y avoir un retard inexpliqué entre la courbe biphasique de la FC et celle de la température. Bien qu'elle soit difficile à interpréter, cette observation semble rappeler la bradycardie relative également connue sous le nom de dissociation sphymothermique observée dans certaines conditions infectieuses (ex. salmonelle) (Ye et al., 2018). Brièvement, la bradycardie relative est un phénomène qui reflète une manifestation clinique selon laquelle la FC est plus basse que prévu pour une température donnée. On pense que cette bradycardie relative découle des interactions complexes qui existent entre le système immunitaire et les branches sympathique et parasympathique du système nerveux autonome lors d'une inflammation (Kenney et Ganta, 2014). La pathogenèse de la bradycardie relative reste mal connue, il devient donc difficile d'expliquer ce phénomène. Par ailleurs, de façon simpliste, on pense que la libération de cytokines pro-inflammatoires, dès les premières minutes suite à l'injection systémique de LPS, déclenche l'activation du système parasympathique, ce qui a pour conséquence de ralentir la FC. Puis, le ralentissement de la FC entraînerait une activation du système sympathique, qui serait subséquent responsable d'une augmentation de la FC (Ye et al., 2018). Toutefois, ce retard entre la FC et la température demeure inexpliqué.

Une diminution de la VFC a aussi été révélée suite à l'injection de LPS chez les agneaux à terme. Pour la première fois, une diminution des indices de connectivité du réseau a pu être observée *via* l'analyse de visibilité horizontale et verticale qui est évocatrice d'une désorganisation précoce de la FC avec une perte d'adaptabilité due à une structure altérée du système de contrôle (Griffin et al., 2005; Beuchee et al., 2009; Madl, 2016). Cette perte d'adaptabilité est synonyme d'une pathologie sous-jacente laissant présager une altération de la FC lors d'une réponse inflammatoire systémique. Néanmoins, à ce stade, il est difficile d'établir plus précisément un lien entre cette diminution de connectivité des réseaux et l'impact direct sur la physiologie du système cardiaque. L'analyse de visibilité est particulièrement prometteuse en tant que nouvelle méthode de diagnostic précoce du sepsis néonatal puisqu'elle permet de mettre en évidence des altérations de façon plus marquée et plus sensible que lors des analyses plus conventionnelles de la VFC. Or, nous pensons que l'analyse de visibilité cardiaque pourrait fournir un moyen plus précoce pour le diagnostic d'un LOS chez les nouveau-nés prématurés permettant ainsi d'instaurer rapidement un traitement approprié et éviter les risques complications majeurs.

Conséquences de l'injection de LPS sur la réflexivité du système nerveux autonome

Aucune amplification de l'inhibition cardiorespiratoire liée aux chémoréflexes laryngés et pulmonaires

Bien que cela n'ait pas atteint la significativité statistique ($p = 0.05$), il semble y avoir un contrôle plus vagal et moins sympathique (ratio LF/HF diminué); nous avons donc voulu confirmer la prépondérance du contrôle vagal en étudiant la réflexivité du système nerveux autonome afin d'expliquer, en partie, l'augmentation des ralentissements cardiaques. En d'autres termes, nous voulions savoir si le LPS entraînerait une amplification des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs (apnées, bradycardies, désaturations), lors de la stimulation des chémoréflexes laryngés et pulmonaires connus pour générer ce type de réflexes. Cette

hypothèse provient du fait qu'il a été démontré que des stress postnataux augmentent les apnées et les bradycardies observées lors des chémoréflexes laryngés et pulmonaires (Lindgren et Groggaard, 1996; Froen et al., 2000; Xia et al., 2008; St-Hilaire et al., 2010; Carreau et al., 2011). Or, chez un second groupe d'agneau à terme ($n = 8$), nos résultats n'ont montré aucune exacerbation de l'inhibition cardiorespiratoire lors des chémoréflexes laryngés et pulmonaires, que ce soit 30 min, 2 h ou 24 h post injection de LPS. Une amplification de cette inhibition n'aurait pas été surprenante étant donné qu'il est connu que, dans un contexte inflammatoire, l'activité vagale efférente est une composante majeure (Tracey, 2002). Toutefois, il ne faut pas oublier que, pour cette étude, nos agneaux sont nés à terme et en santé, ce qui pourrait expliquer l'absence de cette amplification des composantes cardiorespiratoires des chémoréflexes laryngés et pulmonaires. Ainsi, il serait pertinent d'étudier la réflexivité du système nerveux autonome chez un modèle d'agneau prématuré ayant un système de contrôle neural plus immature, afin de valider si l'injection de LPS induit une inhibition cardiorespiratoire plus marquée (St-Hilaire et al., 2007).

Effet de l'injection de LPS sur l'inflammation du tronc cérébral (résultats préliminaires)

Augmentation des concentrations de cytokines. Il est connu que l'augmentation des concentrations de cytokines peut précéder les preuves cliniques d'une infection (Bentlin et Suppo de Souza Rugolo, 2010). C'est pourquoi, à l'aide de collaborateurs, nous avons mis en évidence que l'expression de l'ARNm de IL-8 et TNF- α au niveau du tronc cérébral avait une tendance à l'augmentation 6 h après l'injection de LPS, contrairement à la condition contrôle. L'étude d'IL-8 et TNF- α a été privilégiée puisqu'ils sont connus comme étant des marqueurs précoces de l'infection (Bentlin et Suppo de Souza Rugolo, 2010). Il était donc plus logique qu'ils soient détectés seulement 6 heures suite à l'induction d'une inflammation systémique contrairement à d'autres médiateurs inflammatoires qui prennent plus de temps avant d'être sécrétés. Cependant, nos résultats montrent une grande variabilité dans les niveaux d'IL-8 et de TNF- α entre chaque animal. Une des

hypothèses de cette observation serait un décalage entre l'injection de LPS et le temps de mise en œuvre de la réponse inflammatoire au niveau du tronc cérébral expliquant, ainsi, que pour certains agneaux, 6 heures ne seraient pas suffisantes pour la détection de ces cytokines. Il est possible que le tissu cérébral n'ait pas encore commencé à répondre au stress systémique et qu'une étude à un temps plus tardif aurait démontré une augmentation chez ces agneaux. Toutefois, il est également possible qu'après 6 heures, les niveaux d'expression de l'ARNm d'IL-8 et TNF- α aient déjà commencé à diminuer et qu'une étude à un temps plus précoce aurait permis de les détecter. En effet, cette variabilité interindividuelle a également été observée dans une autre étude chez l'agneau nouveau-né (130 jours de gestation) entre les échantillons sériques, même avec une plus grande cohorte d'animaux (LPS n = 14 ; contrôle n = 10) (Durosier et al., 2015). En effet, durant les 54 heures d'observation (mesure prise à 1, 3, 6, 24, 48, 54 h), seul un pic significatif d'IL-6 a été observé 3 heures suite à l'injection de LPS. Il est à noter qu'à chaque prise de mesures, les écarts-types étaient également élevés. Pour ce qui est du TNF- α , il n'a jamais atteint la significativité durant les 54 heures d'observation et a également montré des écarts-types élevés à chaque prise de mesures (Durosier et al., 2015). De plus, le même groupe de recherche a montré des résultats similaires pour une plus petite cohorte d'animaux (LPS n = 10 ; contrôle n = 5), soit un seul pic significatif d'IL-6 sérique à 3 heures post injection de LPS avec de très grands écarts-types à chaque prise de mesures durant les 54 heures d'expérimentation (Herry et Cortes, 2016). Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de détection des cytokines IL-8 (n = 2) et TNF- α (n = 1) chez certains animaux serait possiblement due à un problème lors de la prise de l'échantillon ou dans la conservation de l'échantillon.

Activation microgliale. Les analyses qualitatives ont montré une activation microgliale au niveau du tronc cérébral. En effet, une augmentation du nombre de cellules microgliales (macrophages du système nerveux) activées dans la région rostrale ventrolatérale du bulbe rachidien (région contenant des centres cardiorespiratoires importants) a été observée. La

morphologie des cellules microgliales définie par un petit corps cellulaire et de fins prolongements en condition quiescente a évolué vers une forme moins ramifiée avec un corps cellulaire et un volume territorial plus grand, synonyme d'une pathologie et d'une inflammation cérébrale (Audinat et Arnoux, 2014).

Bien que préliminaires, ces résultats sont particulièrement pertinents puisqu'ils fournissent une preuve de concept que l'inflammation du tronc cérébral (à proximité des centres cardiorespiratoires) est présente chez notre modèle d'agneau nouveau-né et pourrait être responsable des différentes altérations cardiorespiratoires que nous avons mentionnées. En effet, il est acceptable de croire que les cytokines inflammatoires pourraient bel et bien jouer un rôle important dans les altérations cardiorespiratoires, soit en étant produites localement (surtout par les cellules microgliales), soit en traversant les organes circumventriculaires. Ces résultats préliminaires sur l'inflammation concordent avec ceux obtenus chez les rats néonataux montrant que les cytokines peuvent altérer les centres de contrôle respiratoire du tronc cérébral, en partie via la synthèse de la PGE₂ (Gresham et al., 2011; Stojanovska et al., 2018).

Limites de l'étude

Notre étude présente, cependant, certaines limites en tant que modèle de sepsis bactérien. L'agneau, physiologiquement plus proche du nouveau-né humain, est un excellent modèle animal pour étudier la physiopathologie des maladies néonatales; toutefois, l'injection de LPS constitue principalement un modèle d'inflammation systémique aiguë et transitoire. En revanche, chez l'humain, le sepsis se développe sur plusieurs heures ou jours entraînant une évolution clinique prolongée (Zanotti-Cavazzoni, 2009). Les caractéristiques temporelles du sepsis bactérien chez l'humain restent donc différentes de celles observées chez notre modèle d'agneau. De plus, l'injection en bolus d'endotoxines (LPS) provoque rapidement une augmentation des cytokines proinflammatoires chez des modèles animaux alors que cette élévation est échelonnée sur une plus longue période de temps chez

l'humain, rendant difficile de reproduire entièrement la complexité clinique du sepsis chez l'animal (Zanotti-Cavazzoni, 2009). Ces limites peuvent expliquer, en partie, l'absence d'apnées et de bradycardies dans notre modèle. Bien que nos agneaux présentent une tachycardie et une tachypnée, reconnues pour être des signes de sepsis néonatal chez le nouveau-né humain, les apnées-bradycardies sont souvent les premières manifestations cliniques, surtout chez le prématuré avec un LOS (Weber et al., 2008; Beuchée et al., 2009; Zuckerbraun et al., 2009). Toutefois, l'absence d'apnées-bradycardies n'est pas surprenante puisque nos agneaux sont nés à terme et en santé, ce qui constitue une autre limite. Les résultats chez l'agneau à terme étaient, cependant, indispensables afin de mettre au point le modèle et vont permettre d'ouvrir la voie à des études similaires chez l'agneau prématuré ayant une immaturité neurale accrue (Renolleau et al., 1999; St-Hilaire et al., 2007; Nault et al., 2017).

De plus, il faut être prudent quant aux résultats sur l'inflammation au niveau du tronc cérébral. En effet, la présence d'une inflammation fournit uniquement une preuve de concept qu'une inflammation peut être induite à proximité des centres de contrôle cardiorespiratoires suite à l'injection de LPS et qu'elle est probablement responsable des altérations cardiorespiratoires obtenues. Ceci est une toute première étape pour l'analyse de l'inflammation chez l'agneau. Par ailleurs, l'étude de l'inflammation dans le tronc cérébral devra être réalisée chez l'agneau prématuré et avec un plus grand nombre d'animaux.

Finalement, des agneaux mâles uniquement ont été étudiés dans cet article. Puisque chaque sexe possède des caractéristiques physiologiques spécifiques (ex. niveaux hormonaux différents), en choisissant les mâles, cela permet d'assurer une moindre variabilité dans les résultats obtenus d'un agneau à l'autre. Toutefois, cela constitue une limitation significative. Il a été montré que le contrôle respiratoire est différent chez les mâles et les femelles (Kinkead et Schlenker, 2017). Le sexe masculin semble être plus vulnérable aux pathologies cardiorespiratoires (ex. SMSN) (Baldi et al., 2017). Des études futures doivent inclure des femelles afin de mettre en évidence les différences éventuelles.

Conclusion

Les résultats de notre étude ont révélé que l'injection de LPS entraîne des manifestations cliniques (augmentation de la température centrale et diminution de l'activité locomotrice et de l'éveil agité) et des altérations cardiorespiratoires (augmentation des fréquences cardiaque et respiratoire). De plus, les analyses de variabilité ont montré une moins bonne capacité de régulation des systèmes cardiaque et respiratoire. L'injection IV de LPS chez les agneaux à terme mime donc plusieurs caractéristiques de la phase précoce du sepsis bactérien. Les altérations cardiorespiratoires répertoriées sont, pour la plupart, complexes et peuvent s'expliquer, en partie, par une tendance à la hausse des marqueurs inflammatoires précoces au niveau du tronc cérébral. Des études subséquentes chez l'agneau prématuré seront essentielles afin de mieux représenter le contexte clinique, c'est-à-dire les nouveau-nés prématurés présentant un LOS.

1.4. Modèle de sepsis bactérien vs. modèle de sepsis viral

Comparaison entre le modèle de sepsis bactérien et le modèle de sepsis viral

Lors de mes études doctorales, en plus de mettre au point un modèle ovin d'inflammation systémique relié au sepsis bactérien, j'ai également réalisé un modèle d'inflammation systémique relié au sepsis viral comme il est connu que plusieurs agents pathogènes viraux respiratoires sont impliqués dans des cas de LOS chez la population pédiatrique. Puisque cet article (article 3) n'est pas encore soumis, les analyses de variabilité cardiaque et respiratoire n'étant pas entièrement terminées à ce jour, il sera présenté en annexe. Cependant, il était d'une grande pertinence de comparer les résultats obtenus entre les deux modèles de sepsis afin de tenter d'identifier des pistes d'investigation pouvant aider les cliniciens dans la reconnaissance de l'origine d'un sepsis. En effet, poser le diagnostic définitif de sepsis viral chez un nouveau-né est un défi majeur en clinique. Pour ce faire, je présenterai notre modèle d'inflammation systémique lors d'un sepsis viral et je comparerai les résultats obtenus jusqu'à maintenant avec notre modèle d'inflammation systémique lors d'un sepsis bactérien.

Modèle d'inflammation systémique relié à un sepsis viral

De nombreux agents pathogènes viraux respiratoires tels que les coronavirus, l'entérovirus, le métapneumovirus humain, l'influenza, la parainfluenza, le virus respiratoire syncytial et le rhinovirus ont été signalés comme des causes potentielles de LOS chez les nouveau-nés prématurés en unités de soins intensifs néonataux (Gagneur et al., 2008; Bennett et al., 2012; Santos et al., 2015; Cerone et al., 2017). Bien que les virus puissent être impliqués dans des cas de LOS, très peu de choses sont connues dans la littérature entre les infections virales respiratoires et les modifications du contrôle cardiorespiratoire au cours de la période néonatale. Évidemment, on sait que le LOS est souvent associé à des événements cardiorespiratoires sévères pouvant entraîner des complications potentiellement mortelles

(Mayr et al., 2014; Singer et al., 2016; Shane et al., 2017). Le sepsis néonatal est généralement présumé d'origine bactérienne jusqu'à preuve du contraire, mais souvent les cultures bactériennes s'avèrent finalement négatives (Gupta et al., 2018). Or, la prise en compte d'un sepsis viral est importante en clinique puisque sa reconnaissance a des implications majeures, entre autres, sur l'utilisation prolongée d'antibiotique, l'éventuelle résistance antibactérienne et la durée d'hospitalisation (Gupta et al., 2018; Lin et al., 2018). À ce jour, la reconnaissance de l'origine d'un sepsis est particulièrement difficile puisqu'aucun marqueur idéal n'a été identifié et que les manifestations cliniques sont non spécifiques et très similaires lors d'un LOS d'origine bactérienne ou virale (Cerone et al., 2017). C'est pourquoi nous souhaitons trouver des différences pouvant aider les cliniciens dans ce défi.

Étant donné que la majorité des virus produisent de l'ARN double brin à un moment au cours de leur réplication (Jacobs et Langland, 1996), nous avons choisi le Poly I:C, un analogue d'ARN double brin viral synthétique afin de mimer l'inflammation systémique lors d'un sepsis viral chez huit agneaux nés à terme et en santé. Le Poly I:C est un agoniste du TLR3 qui, lui, est impliqué dans les infections à rhinovirus, virus influenza et virus respiratoire syncytial responsables d'apnées et de bradycardies néonatales (Schroeder et al., 2013; Rudd et al., 2015). Ces apnées-bradycardies peuvent également être impliquées dans des cas de SMSN dans les premières 4-6 semaines de vie chez les prématurés, mais également chez les nouveau-nés à terme (Blood-Siegfried, 2009; Carlin et Moon, 2017). Les doses de Poly I:C utilisées dans la littérature sont très variables selon les espèces (0.25 µg/kg - 25 mg/kg) (Krueger et al., 1988; Cooper et al., 1988; Chuang et al., 1990; Soszynski et al., 1991; Hiramoto et al., 1991; Kimura et al., 1994; Fortier et al., 2004; Bauman et al., 2014) et inconnues chez l'agneau nouveau-né. Dans notre étude, le bolus de 300 µg/kg de Poly I:C a été sélectionné à la suite de nos études pilotes chez l'agneau. Une revue de la littérature a révélé qu'aucune étude n'a examiné les effets du Poly I:C sur les altérations du contrôle cardiorespiratoire en période néonatale.

Modèle de sepsis bactérien vs. modèle de sepsis viral

Brièvement, il faut savoir que la signalisation des TLR implique principalement deux voies. Il y a une voie dépendante de MyD88 (commune à tous les TLR), qui se traduit par l'activation de facteurs de transcription NF- κ B impliqués dans l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires, et une voie indépendante de MyD88 (propre à TLR3 et TLR4) impliquée dans l'expression des interférons de type I (IFN α et IFN β) (Takeda et al., 2004; Jensen et Thomsen, 2012; Kawasaki et Kawai, 2014). Comme les TLR4 (LPS) et les TLR3 (Poly I:C) activent visiblement les mêmes voies, on suspecte que les manifestations cardiorespiratoires devraient être similaires entre un sepsis bactérien et viral, ce qui expliquerait, en partie, la reconnaissance difficile. Il est également connu que les symptômes cliniques du sepsis viral sont souvent indiscernables du sepsis bactérien (Gupta et al., 2018; Lin et al., 2018). Toutefois, à l'aide d'analyses détaillées sur une multitude de variables et des analyses de variabilité cardiorespiratoire plus raffinées, nous avons voulu tester l'hypothèse que nous pouvons observer des altérations plus subtiles permettant de faire la distinction entre les deux sepsis.

Température rectale

Tout comme pour le LPS, l'injection de Poly I:C a induit une augmentation biphasique de la température rectale, phénomène également observé chez le lapin (pic de température à environ 1h30 et 3h) (Soszynski et al., 1991). Contrairement au sepsis bactérien, on connaît peu de choses sur les mécanismes des réponses reliées au sepsis viral, cependant, il a été suggéré que le Poly I:C induit une réponse fébrile par des mécanismes centraux similaires à ceux déclenchés par le LPS au niveau du cerveau (Fortier et al., 2004). Cette élévation de la température serait, en outre, attribuable à l'activité pyrogène de l'IL-1, l'IL-6, des IFN et du TNF- α . Ces médiateurs inflammatoires augmentent la synthèse de la prostaglandine E2 dans l'hypothalamus, entraînant ainsi une élévation de la température centrale (Gupta et al., 2018). En effet, chez les rats adultes, il a été montré que le niveau d'expression de

l'ARNm d'IL-1 et COX-2 était augmenté par le Poly I:C, deux acteurs importants dans la synthèse des prostaglandines qui, elles, sont nécessaires à l'induction de la réponse fébrile (Fortier et al., 2004).

Mobilité et sommeil

Alors que des études ont démontré que le LPS induit une variété de réponses comportementales (diminution de la mobilité, somnolence et augmentation du sommeil) (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005; Nault et al., 2020), des données limitées sont disponibles pour le Poly I:C chez les animaux nouveau-nés. Au niveau de la mobilité et des stades de conscience, on retrouve des observations similaires suite à l'injection de LPS ou de Poly I:C. Comme le LPS, l'injection de Poly I:C a diminué l'activité locomotrice et l'éveil agité chez les agneaux par rapport à la condition contrôle. En effet, le Poly I:C a significativement augmenté le sommeil NREM au détriment de l'éveil agité. Cette observation concorde avec une étude chez des lapins adultes qui a montré une augmentation du temps passé en sommeil NREM après l'injection de Poly I:C (Krueger et al., 1988). Dans la littérature, il est connu que le sommeil est particulièrement sensible aux pathologies de la plupart des systèmes physiologiques et est souvent associé à une infection systémique (Krueger et al., 1988; Krueger et al., 2017). Les mécanismes par lesquels les virus peuvent induire le sommeil ne sont pas bien compris. Toutefois, des altérations du sommeil pourraient être attribuables à l'ARN double brin produit lors de la réplication virale qui pourrait provoquer un sommeil excessif par des effets toxiques directs ou en induisant la production d'interférons (INF- α) et de cytokines pro-inflammatoires (ex. IL-1, TNF- α). Ces substances partagent la capacité d'avoir des propriétés somnogènes et pyrogènes (Shoham et al., 1987; Kueger et al., 1988; Krueger et al., 2017). Cette hypothèse est plausible, car le Poly I:C, un ARN double brin synthétique, peut induire la production d'interférons *via* des mécanismes similaires à ceux utilisés par l'ARN double brin viral (Krueger et al., 2017). Ainsi, pour ce qui est des manifestations cliniques (température, activité locomotrice et stade de conscience), il semble difficile de faire la différence entre un sepsis bactérien et viral.

Altérations cardiorespiratoires

Globalement, l'injection de Poly I:C a induit une augmentation de la FC et une altération de la VFC sans altération de la f_R et de la PAM. De plus, les courbes de la FC et de la f_R suivent les variations biphasiques de la température rectale des agneaux. Fait intéressant, chez les enfants atteints de sepsis, plusieurs manifestations allant de la tachypnée légère au syndrome de détresse respiratoire aiguë et de la tachycardie légère au choc septique peuvent être observées selon le type de virus (Gupta et al., 2018).

Jusqu'à maintenant, aucune étude n'avait évalué l'effet de l'injection de Poly I:C sur l'activité cardiaque chez l'animal en période néonatale. D'abord, comme pour le LPS, l'injection de Poly I:C a significativement augmenté la FC par rapport à la condition contrôle. Cette augmentation de la FC peut s'expliquer par le fait que le Poly I:C induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (ex. IL-6, IL-1 β , TNF- α) (Badke 2018), qui ont un effet sympathoexcitateur sur le système nerveux autonome. En effet, les cytokines peuvent se rendre au niveau des centres de contrôle cardiovasculaire du tronc cérébral, soit en étant transportées à travers la barrière hémato-encéphalique, soit en pénétrant à travers les organes circumventriculaires (Badke 2018). Cependant, l'évolution temporelle biphasique de la FC suit directement celle de la température rectale chez les agneaux après injection de poly I:C, ce qui diffère de ce qui était observé suite à l'injection de LPS (relation décalée entre la FC et la température). Malheureusement, nous n'avons pas d'explication pour la différence de la relation entre la FC et la température après injection de LPS ou de Poly I:C.

De plus, une diminution de la VFC a été révélée suite à l'injection de Poly I:C chez les agneaux à terme, phénomène également observé suite à l'injection de LPS. Physiologiquement, les résultats de l'analyse de variabilité semblent refléter une augmentation de l'activité sympathique et/ou une diminution de l'activité vagale au niveau cardiaque (ratio LF/HF augmenté). Ce résultat est cohérent avec l'augmentation significative de la FC et pourrait expliquer, en partie, l'absence de ralentissements

cardiaques, ce qui diffère de l'injection de LPS. En effet, bien qu'il n'atteigne pas la significativité ($p = 0.05$), le ratio LF/HF est diminué lors de l'injection de LPS par rapport à la condition contrôle ce qui suggère un contrôle cardiaque plus vagal et/ou moins sympathique. Par ailleurs, les analyses de visibilité cardiaque n'ont pas encore été achevées pour les agneaux injectés avec le Poly I:C. Il sera donc pertinent de comparer les résultats afin de savoir si les analyses de visibilité pourront discerner des différences plus subtiles au niveau cardiaque.

Concernant la f_R , tout comme la FC, aucune étude n'avait évalué l'effet du Poly I:C sur l'activité respiratoire chez l'animal en période néonatale. Contrairement à l'injection de LPS, le Poly I:C n'a pas modifié la f_R ni la VFR chez les agneaux à terme. Cette différence, avec le rapport LF/HF opposé, semble être les seules au niveau cardiorespiratoire. Éventuellement, nous allons également procéder à l'analyse de visibilité au niveau respiratoire chez les groupes LPS et Poly I:C. Cette analyse n'a pas encore été réalisée en condition LPS, il sera donc pertinent de comparer les résultats avec la condition Poly I:C dans l'article 3.

Inflammation du tronc cérébral (résultats très préliminaires)

L'expression de l'ARNm de IL-8, IL-6, TNF- α et Caspase-3 au niveau du tronc cérébral avait une tendance à l'augmentation 6 heures suite à l'injection de Poly I:C contrairement à la condition contrôle. Nos résultats montrent une certaine variabilité interindividuelle probablement en raison du faible nombre d'échantillons ($n = 4$). Par ailleurs, une étude chez des rats adultes (Poly I:C $n = 3$; contrôle $n = 3$) a montré des concentrations plasmatiques d'IL-6 et de TNF- α significativement augmentées à 2 heures, avec retour au niveau de base 4 heures suivant l'injection de Poly I:C (Fortier et., 2004).

Cette variabilité interindividuelle a également été observée après l'injection de LPS pour IL-8 et TNF- α chez les agneaux nouveau-nés (Nault et al., 2020). Les hypothèses pour expliquer cette observation sont les mêmes que pour le modèle LPS, soit le temps de mise en oeuvre de la réponse inflammatoire au cerveau après l'injection de Poly I:C est supérieur à 6 h, soit

le moment de l'étude à 6 heures est trop tardif pour obtenir encore des niveaux suffisants d'ARNm. À noter que les niveaux d'expression de l'ARNm d'IL-8 et de TNF- α étaient similaires 6 heures après l'injection de LPS ou de Poly I:C.

Ces résultats préliminaires sont essentiels puisqu'ils fournissent une preuve de concept que l'inflammation cérébrale est présente près des centres cardiorespiratoires chez notre modèle d'agneau nouveau-né suite à l'injection de Poly I:C. Ces cytokines inflammatoires pourraient être incriminées dans les altérations cardiorespiratoires lors d'un sepsis viral.

Conclusion

D'après nos résultats, il y a énormément de similitudes, tant au niveau des manifestations cliniques que des altérations cardiorespiratoires, entre notre modèle d'inflammation systémique bactérien et viral. De plus, les résultats semblent être en faveur d'un faible pouvoir discriminant de la variabilité cardiaque entre un sepsis viral et bactérien (sauf si l'analyse de visibilité pour la variabilité cardiaque après injection de Poly I:C donne un résultat inverse). Il existe cependant un effet du LPS sur la respiration qui est absent avec le Poly I:C (augmentation de la f_R et diminution de la VFR), ce qui suggère de travailler sur l'exploration non invasive de la respiration. D'ailleurs, l'analyse de visibilité pour la variabilité respiratoire est à venir pour la condition LPS et Poly I:C.

Il faut noter que, dans nos modèles, comme nous mesurons essentiellement les adaptations à l'inflammation en amont de la défaillance d'organe, il est possible d'être dans une phase précoce où une réponse systémique différenciée TLR3/TLR4 n'est pas encore manifeste. Malheureusement, la comparaison de nos études n'a montré aucune différence majeure et renforce l'idée de base d'un défi de taille dans la distinction de l'origine d'un sepsis néonatal pour les cliniciens.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En conclusion, les résultats de mes études doctorales sont uniques et apportent de nouvelles connaissances qui contribuent à une meilleure compréhension des pathologies néonatales. L'étude des altérations cardiorespiratoires en condition de reflux gastro-oesophagien ou de sepsis néonatal est pertinente tant sur le plan physiologique que clinique. En effet, ces études permettent la caractérisation complète des événements cardiorespiratoires lors de situations fréquemment rencontrées en clinique. Notre modèle prématuré a montré des apnées-bradycardies cliniquement significatives lors d'une stimulation oesophagienne suggérant une importance majeure dans la compréhension de la pathogénie de pathologies telles que les apnées-bradycardies du prématuré, les malaises sévères et le SMSN. Concernant les modèles d'inflammation systémique lors d'un sepsis néonatal, bien qu'aucune apnée-bradycardie n'ait été observée, ils nous ont permis d'étudier en détail toutes les variables cardiorespiratoires en plus de tester une nouvelle analyse très prometteuse dans le diagnostic précoce d'un LOS, l'analyse de visibilité pour étudier la variabilité de la fréquence cardiaque. La reconnaissance précoce des signes et symptômes d'un sepsis contribue à l'amélioration du pronostic néonatal afin d'éviter, entre autres, le risque de lésions cérébrales et de troubles développementaux. Pour la première fois, nous avons pu comparer un modèle de sepsis bactérien et viral afin de comprendre davantage le lien entre les altérations du contrôle cardiorespiratoire et les infections durant la période néonatale.

PERSPECTIVES

Notre première étude a mis en lumière la possibilité qu'un reflux gastro-œsophagien puisse engendrer des réflexes cardiorespiratoires inhibiteurs à point de départ œsophagien chez l'agneau prématuré. De plus amples études devront être réalisées chez l'animal afin d'évaluer les différentes méthodes existantes pour contrer les événements cardiorespiratoires d'origine œsophagienne. Sont ainsi prévues chez l'agneau prématuré l'étude de l'effet de la caféine et de la CPAP nasale, traitements habituels des événements cardiorespiratoires de toute origine chez le prématuré. Il est important de rappeler que notre équipe a précédemment montré que les événements cardiorespiratoires déclenchés dans le cadre des chémoréflexes laryngés étaient inhibés de façon importante et reproductible par la CPAP nasale à 6 cmH₂O chez tous les agneaux prématurés de l'étude, alors que l'effet de la caféine était fort inconstant et globalement non significatif chez les mêmes agneaux (Boudaa et al., 2013). Pour le moment, nous n'avons aucun argument pour prédire si un effet semblable existe pour les événements d'origine œsophagienne. Dans un deuxième temps, les résultats de telles études précliniques sur la caféine et la CPAP nasale devront bien sûr être confirmés chez le prématuré humain.

Les études sur le sepsis néonatal chez l'agneau à terme sont les toutes premières étapes d'un programme de recherche du laboratoire. L'agneau à terme représente certains avantages lors de la mise au point d'un modèle : il est moins coûteux, le taux de décès est très faible et il nécessite moins de soins postnatals immédiats. Du point de vue physiologique, cette première étape ouvre la voie pour des études futures chez l'agneau prématuré, qui permettront d'étudier l'effet spécifique de la prématurité lors d'une inflammation systémique. Ces études sont particulièrement pertinentes en rapport avec le sepsis d'apparition tardif chez les prématurés en soins intensifs néonataux et doivent être réalisées. Du point de vue clinique, il est pertinent d'optimiser la surveillance continue de la VFC en l'instaurant d'emblée chez tous les prématurés jugés à risque, et en ajoutant la

surveillance continue de variables plus discriminantes que celles disponibles actuellement (ex : système HeRO). Dans cette optique, l'ajout de la surveillance continue de la VFR, ainsi que des variables tirées des analyses de visibilité horizontales et verticales, semble particulièrement intéressant au vu de nos résultats. Cette surveillance continue est importante pour le diagnostic plus précoce du sepsis en soins intensifs néonataux et permettra de diminuer la morbidité et mortalité importantes qui y sont encore associées.

RÉFÉRENCES

- Abu-Shaweesh, J. M., Martin, R. J.** (2008). Neonatal apnea: what's new? *Pediatr Pulmonol* 43(10): 937-944. doi: 10.1002/ppul.20832.
- Abu Jawdeh, E. G., Martin, R. J.** (2013). Neonatal apnea and gastroesophageal reflux (GER): is there a problem? *Early Hum Dev* 89 Suppl 1: S14-16. doi: 10.1016/S0378-3782(13)70005-7.
- Adam-Chapman, I., Stoll, B. J.** (2006). Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. *Curr Opin Infect Dis* 19: 290-297. doi: 10.1097/01.qco.0000224825.57976.87.
- Akiba, Y., Kaunitz J. D.** (2011). Luminal chemosensing in the duodenal mucosa. *Acta Physiol (Oxf)* 201(1): 77-84. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02149.x.
- Al-Matary, A., Kutbi, I., Qurashi, M., Khalil, M., Alvaro, R., Kwiatkowski, K., Cates, D., Rigatto, H.** (2004). Increased peripheral chemoreceptor activity may be critical in destabilizing breathing in neonates. *Semin Perinatol* 28(4): 264-272. doi: 10.1053/j.semperi.2004.08.003.
- Al-Omar, S.** (2017). Systèmes de contrôle cardiovasculaire et respiratoire et leur interaction en période néonatale. Thèse de doctorat, Rennes 1 en cotutelle avec l'Université de Sherbrooke.
- Alcock, G., Liley, H. G., Cooke, L., Gray, P. H.** (2017). Prevention of neonatal late-onset sepsis: a randomised controlled trial. *BMC Pediatr* 17(1): 98. doi: 10.1186/s12887-017-0855-3.
- Alheid, G. F., McCrimmon, D. R.** (2008). The chemical neuroanatomy of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 164(1-2): 3-11. doi: 10.1016/j.resp.2008.07.014.
- Anderson, J. W., Fisher, J. T.** (1993). Capsaicin-induced reflex bronchoconstriction in the newborn. *Respir Physiol* 93(1) : 13-27. doi: 10.1016/0034-5687(93)90064-h.
- Anderson, T.M., Ramirez, J.M.** (2017). Respiratory rhythm generation: triple oscillator hypothesis. *F1000Res* 6:139. doi:10.12688/f1000research.10193.1.
- Arsenault, J., Moreau-Bussiere, F., Reix, P., Niyonsenga, T., Praud, J. P.** (2003). Postnatal maturation of vagal respiratory reflexes in preterm and full-term lambs. *J Appl Physiol.* 94(5): 1978-1986. doi: 10.1152/japplphysiol.00480.2002.

Aubier, M., Crestani, B., Fournier, M., Mal, H. (2009). *Traité de pneumologie*. Paris. 2^e édition. ISBN-13 : 978-2257160522.

Audinat, E., Arnoux, I. (2014). [Microglia: immune cells sculpting and controlling neuronal synapses]. *Med Sci (Paris)* 30(2): 153-159. doi: 10.1051/medsci/20143002012.

Badke, C. M., Marsillio, L. E., Weese-Mayer, D. E., Sanchez-Pinto, L. N. (2018). Autonomic Nervous System Dysfunction in Pediatric Sepsis. *Frontiers in Pediatrics* 6(280). doi: 10.3389/fped.2018.00280.

Bailey, E. F., Fregosi, R. F. (2006). Modulation of upper airway muscle activities by bronchopulmonary afferents. *J Appl Physiol* (1985) 101(2): 609-617. doi: 10.1152/jappphysiol.00204.2006.

Balan, K. V., Kc, P., Hoxha, Z., Mayer, C. A., Wilson C. G., Martin, R. J.. (2011). Vagal afferents modulate cytokine-mediated respiratory control at the neonatal medulla oblongata. *Respir Physiol Neurobiol* 178(3): 458-464. doi: 10.1016/j.resp.2011.03.003.

Baldy, C., Chamberland, S., Fournier, S., Kinkad, R. (2018). Sex-specific consequences of neonatal stress on cardio-respiratory inhibition following laryngeal stimulation in rat pups. *eNeuro* 4(6): ENEURO.0393-17.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0393-17.

Barnes, P. J. (2012). Chapter 41- Autonomic Control of the Lower Airways in *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)*. pp. 201-204. doi https://doi.org/10.1016/C2010-0-65186-8. ISBN 978-0-12-386525-0.

Bauer, A., Kantelhardt, J. W., Barthel, P., Schneider, R., Makikallio T., Ulm, K., Hnatkova, K., Schomig, A., Huikuri, H., Bunde, A., Malik, M., Schmidt G. (2006). Deceleration capacity of heart rate as a predictor of mortality after myocardial infarction: cohort study. *Lancet* 367(9523): 1674-1681. doi: 10.1016/s0140-6736(06)68735-7.

Bekhof, J., Reitsma, J. B., Kok, J. H., Van Straaten, I. H. (2013). Clinical signs to identify late-onset sepsis in preterm infants. *Eur J Pediatr* 172(4): 501-508. doi: 10.1007/s00431-012-1910-6.

Bentlin, M. Regina., Suppo de Souza Rugolo, L. M. (2010). Late-onset Sepsis: Epidemiology, Evaluation, and Outcome, *NeoReviews* 11(8): e426-e435. doi: https://doi.org/10.1542/neo.11-8-e426.

Besson, M., Desmeules, J., Piguet, V. (2008). Prise en charge médicamenteuse de la douleur neuropathique : quelle place pour les traitements topiques? *Rev Med Suisse* 4(162) : 1498-1504. PMID: 18649596.

- Beuchee, A., Carrault, G., Bansard, J. Y., Boutaric, E., Betremieux, P., Pladys, P.** (2009). Uncorrelated randomness of the heart rate is associated with sepsis in sick premature infants. *Neonatology* 96(2): 109-114. doi: 10.1159/000208792.
- Beuchee, A., Hernandez, A. I., Duvareille, C., Daniel, D., Samson, N., Pladys, P., Praud, J. P.** (2012). Influence of hypoxia and hypercapnia on sleep state-dependent heart rate variability behavior in newborn lambs. *Sleep* 35(11): 1541-1549. doi: 10.5665/sleep.2206.
- Beuchee, A., Nsegbe, E., St-Hilaire, M., Carrault, G., Branger, B., Pladys, P., Praud, J. P.** (2007). Prolonged dynamic changes in autonomic heart rate modulation induced by acid laryngeal stimulation in non-sedated lambs. *Neonatology* 91(2): 83-91. doi: 10.1159/000097124.
- Bielefeldt, K., Davis, B. M.** (2008). Differential effects of ASIC3 and TRPV1 deletion on gastroesophageal sensation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(1): G130-138. doi: 10.1152/ajpgi.00388.2007.
- Billiards, S. S., Walker, D. W., Canny, B. J., Hirst, J. J.** (2002). Endotoxin increases sleep and brain allopregnanolone concentrations in newborn lambs. *Pediatr Res* 52(6): 892-899. doi: 10.1203/00006450-200212000-00014.
- Blomqvist, A., Engblom, D.** (2018). Neural Mechanisms of Inflammation-Induced Fever. *Neuroscientist* 24(4): 381-399. doi: 10.1177/1073858418760481.
- Blood-Siegfried, J.** (2000). Sudden infant death syndrome: a toxic response. *AACN Clin Issues* 11(2): 300-308. doi: 10.1097/00044067-200005000-00012.
- Blood-Siegfried, J.** (2009). The role of infection and inflammation in sudden infant death syndrome. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 31(4): 516-523. doi: 10.3109/08923970902814137.
- Bohanon, F. J., Mrazek, A. A., Shabana, M. T., Mims, S., Radhakrishnan, G. L., Kramer, G. C., Radhakrishnan, R. S.** (2015). Heart rate variability analysis is more sensitive at identifying neonatal sepsis than conventional vital signs. *Am J Surg* 210(4): 661-667. doi: 10.1016/j.amjsurg.2015.06.002.
- Boudaa, N., Samson, N., Carrière, V., Germim, P.S., Pasquier, J.C., Bairam, A., Praud, J.P.** (2013). Effects of caffeine and/or nasal CPAP treatment on laryngeal chemoreflexes in preterm lambs. *J Appl Physiol* 114(5): 637-646. doi: 10.1152/japplphysiol.00599.2012.
- Bruhn, F. W., Mokrohisky, S. T., McIntosh K.** (1977). Apnea associated with respiratory syncytial virus infection in young infants. *J Pediatr* 90(3): 382-386. doi: 10.1016/s0022-3476(77)80697-5.

Buck, S.H., Burks, T.F. (1986). The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol Rev* 38(3): 179–226. PMID: 3534898.

Caminita, F., van der Merwe, M., Hance, B., Krishnan, R., Miller, S., Buddington, K., & Buddington, R. K. (2015). A preterm pig model of lung immaturity and spontaneous infant respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308(2): L118–L129. doi: 10.1152/ajplung.00173.2014.

Carlin, R. F., Moon, R. Y. (2017). Risk Factors, Protective Factors, and Current Recommendations to Reduce Sudden Infant Death Syndrome: A Review. *JAMA Pediatr* 171(2): 175-180. doi: 10.1001/jamapediatrics.

Carreau, A. M., Patural, H., Samson, N., Doueik, A. A., Hamon, J., Fortier, P. H., Praud, J. P. (2011). Effects of simulated reflux laryngitis on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J Appl Physiol (1985)* 111(2): 400-406. doi: 10.1152/japplphysiol.00105.2011.

Carroll, J. L., Agarwal, A. (2010). Development of ventilatory control in infants. *Paediatr Respir Rev* 11(4): 199-207. doi: 10.1016/j.prrv.2010.06.002.

Carroll, J. L., Kim, I. (2013). Carotid chemoreceptor "resetting" revisited. *Respir Physiol Neurobiol* 185(1): 30-43. doi: 10.1016/j.resp.2012.09.002.

Carroll, M. S., Kenny, A. S., Patwari, P. P., Ramirez, J. M., Weese-Mayer, D. E. (2012). Respiratory and cardiovascular indicators of autonomic nervous system dysregulation in familial dysautonomia. *Pediatr Pulmonol* 47(7): 682-691. doi: 10.1002/ppul.21600.

Cheng, Y. R., Jiang, B. Y., Chen, C. C. (2018). Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing. *J Biomed Sci* 25(1): 46. doi: 10.1186/s12929-018-0448-y.

Coleridge, H. M., Coleridge, J. C. (1994). Pulmonary reflexes: neural mechanisms of pulmonary defense. *Annu Rev Physiol* 56: 69-91. doi: 10.1146/annurev.ph.56.030194.000441

Corvaglia, L., Zama, D., Gualdi, S., Ferlini, M., Aceti, A., Faldella, G. (2009). Gastro-oesophageal reflux increases the number of apnoeas in very preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 94(3): F188-192. doi: 10.1136/adc.2008.143198.

Cresi, F., Martinelli, D., Maggiora, E., Locatelli, E., Liguori, S. A., Baldassarre, M. E., Cocchi, E., Bertino, E., Coscia, A. (2018). Cardiorespiratory events in infants with gastroesophageal reflux symptoms: Is there any association? *Neurogastroenterol Motil* 30(5): e13278. doi: 10.1111/nmo.13278.

Darnall, R. A. (2010). The role of CO₂ and central chemoreception in the control of breathing in the fetus and the neonate. *Respir Physiol Neurobiol* 173(3): 201-212. doi: 10.1016/j.resp.2010.04.009.

Darnall, R. A. (2013). The carotid body and arousal in the fetus and neonate. *Respir Physiol Neurobiol* 185(1): 132-143. doi: 10.1016/j.resp.2012.06.005.

Davies, A.M., Koenig, J.S., Thach, B.T. (1988). Upper airway chemoreflex responses to saline and water in preterm infants. *J Appl Physiol*. 64(4): 1412–1420. doi: 10.1152/jappl.1988.64.4.1412.

Dekker, J. M., Crow, R. S., Folsom, A. R., Hannan, P. J., Liao, D., Swenne, C. A., Schouten, E. G. (2000). Low heart rate variability in a 2-minute rhythm strip predicts risk of coronary heart disease and mortality from several causes: the ARIC Study. Atherosclerosis Risk In Communities. *Circulation* 102(11): 1239-1244. doi: 10.1161/01.cir.102.11.1239.

Despas, F. X., O; Senard J.M; Verwaerde, P; Curnier, G; Galinier, M; Pathak, A (2006). Chémoréflexes : de la physiologie à leur application pratique. *MT Cardio* 2(3): 321-327.

Dhaka, A., Viswanath, V, Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 29: 135-161. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958.

Di Fiore, J., Arko, M., Herynk, B., Martin, R., Hibbs, A. M. (2010). Characterization of cardiorespiratory events following gastroesophageal reflux in preterm infants. *J Perinatol* 30(10): 683-687. doi: 10.1038/jp.2010.27.

Di Fiore, J. M., Arko, M., Whitehouse, M., Kimball, A., Martin, R. J. (2005). Apnea is not prolonged by acid gastroesophageal reflux in preterm infants. *Pediatrics*. 116: 1059-1063. doi: 10.1542/peds.2004-2757

Di Fiore, J. M., Martin, R. J., Gauda, E. B. (2013). Apnea of prematurity--perfect storm. *Respir Physiol Neurobiol* 189(2): 213-222. doi: 10.1016/j.resp.2013.05.026.

Di Fiore, J. M., Poets, C. F., Gauda, E., Martin, R. J., MacFarlane P. (2016). Cardiorespiratory events in preterm infants: etiology and monitoring technologies. *J Perinatol* 36(3): 165-171. doi: 10.1038/jp.2015.164.

Diaz, V., Arsenault, J., Praud, J. P. (2000). Consequences of capsaicin treatment on pulmonary vagal reflexes and chemoreceptor activity in lambs. *J Appl Physiol* (1985) 89(5): 1709-1718. doi: 10.1152/jappl.2000.89.5.1709.

Diaz, V., Dorion, D., Renolleau, S., Létourneau, P., Kianicka, I., Praud, J.P. (1999). Effects of capsaicin pretreatment on expiratory laryngeal closure during pulmonary edema in lambs. *J Appl Physiol* 86(5): 1570-1577. doi: 10.1152/jappl.1999.86.5.1570.

Djeddi, D., Samson, N., Boudaa, N., Praud, J. P. (2012). Newborn lamb as a new model for studying gastroesophageal reflux. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55(6): 745-746. doi: 10.1097/MPG.0b013e318263cae0.

Djeddi, D., Samson, N., Praud, J.P. (2013). Milk temperature influences esophageal motility in the newborn lamb. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*: 56(1): 27-29 doi: 10.1097/MPG.0b013e318263caca.

Dommergues, M.A., Patkai, J., Renaud, J.C., Evrard, P., Gressens, P. 2000. Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. *Ann Neurol* 47: 54-63. doi: 10.1002/1531-8249(200001)47:1<54::aid-ana10>3.0.co;2-y.

Dong, Y., Speer, C. P. (2015). Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100(3): F257-263. doi: 10.1136/archdischild-2014-306213.

Dumont, F., Kinkead, R. (2010). Neonatal stress and attenuation of the hypercapnic ventilatory response in adult male rats: the role of carotid chemoreceptors and baroreceptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299(5): R1279-R1289. doi: 10.1152/ajpregu.00446.2010. Epub 2010 Sep 1.

Durosier, L. D., Herry, C. L., Cortes, M., Cao, M., Burns, P., Desrochers, A., Fecteau, G., Seely, A. J., Frasch, M. G. (2015). Does heart rate variability reflect the systemic inflammatory response in a fetal sheep model of lipopolysaccharide-induced sepsis? *Physiol Meas* 36(10): 2089-2102. doi: 10.1088/0967-3334/36/10/2089.

Dusenкова, S., Ru, F., Surdenikova, L., Nassenstein, C., Hatok, J., Dusenka, R., Banovcin, P. Jr., Kliment, J., Tatar, M., Kollarik, M. (2014). The expression profile of acid-sensing ion channel (ASIC) subunits ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, and ASIC3 in the esophageal vagal afferent nerve subtypes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307(9): G922-930. doi: 10.1152/ajpgi.00129.2014.

Eichenwald, E. C. (2016). Apnea of Prematurity. *Pediatrics* 137(1). doi: 10.1542/peds.2015-3757.

Eichenwald, E. C. (2018). Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux in Preterm Infants. *Pediatrics* 142(1) pii: e20181061. doi: 10.1542/peds.2018-1061.

Fairchild, K., Mohr, M., Paget-Brown, A., Tabacaru, C., Lake, D., Delos, J., Moorman, J. R., Kattwinkel, J. (2016). Clinical associations of immature breathing in preterm infants: part 1-central apnea. *Pediatr Res* 80(1): 21-27. doi: 10.1038/pr.2016.43.

Fairchild, K. D. (2013). Predictive monitoring for early detection of sepsis in neonatal ICU patients. *Curr Opin Pediatr* 25(2): 172-179. doi: 10.1097/MOP.0b013e32835e8fe6.

Fairchild, K. D., O'Shea, T. M. (2010). Heart rate characteristics: physiomarkers for detection of late-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 37(3): 581-598. doi: 10.1016/j.clp.2010.06.002.

Fanaroff, A. A., Korones, S. B., Wright, L. L., Verter, J., Poland, R. L., Bauer, C. R., Tyson, J. E., Philips J. B 3rd, Edwards, W., Lucey, J. F., Catz, C. S., Shankaran, S., Oh, W. (1998). Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Pediatr Infect Dis J* 17(7): 593-598. doi: 10.1097/00006454-199807000-00004.

Feng, S. Y., Samarasinghe, T., Phillips, D. J., Alexiou, T., Hollis, J. H., Yu, V. Y., Walker, A. M. (2010). Acute and chronic effects of endotoxin on cerebral circulation in lambs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(3): R760-766. doi: 10.1152/ajpregu.00398.2009.

Ferrara, G., Kanoore Edul, V. S., Caminos Eguillor, J. F., Buscetti, M. G., Canales, H. S., Lattanzio, B., Gatti, L., Ince, C., Dubin, A. (2019). Effects of fluid and norepinephrine resuscitation in a sheep model of endotoxin shock and acute kidney injury. *J Appl Physiol* (1985) 127(3): 788-797. doi: 10.1152/ajpregu.00398.2009.

Filiano, J. J., Kinney, H. C. (1994). A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate* 65(3-4): 194-197. doi: 10.1159/000244052

Forleo, G. B., Santini, L., Campoli, M., Malavasi, M., Scaccia, A., Menichelli, M., Riva, U., Lamberti, F., Carreras, G., Orazi, S., Ribatti, V., Di Biase, L., Lovecchio, M., Natale, A., Valsecchi, S., Romeo, F. (2015). Long-term monitoring of respiratory rate in patients with heart failure: the Multiparametric Heart Failure Evaluation in Implantable Cardioverter-Defibrillator Patients (MULTITUDE-HF) study. *J Interv Card Electrophysiol* 43(2): 135-144. doi: 10.1007/s10840-015-0007-3.

Franco, P., Kato, I., Richardson, H. L., Yang, J. S., Montemitro, E., Horne, R. S. (2010). Arousal from sleep mechanisms in infants. *Sleep Med* 11(7): 603-614. doi: 10.1016/j.sleep.2009.12.014.

Freet, C. S., Stoner, J. F., Tang, X. (2013). Baroreflex and chemoreflex controls of sympathetic activity following intermittent hypoxia. *Auton Neurosci* 174(1-2): 8-14. doi: 10.1016/j.autneu.2012.12.005.

Froen, J. F., Akre, H., Stray-Pedersen, B., Saugstad, O. D. (2000). Adverse effects of nicotine and interleukin-1 β on autoresuscitation after apnea in piglets: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 105(4): E52. doi: 10.1542/peds.105.4.e52.

- Funderburk, A., U. Nawab, S. Abraham, J. DiPalma, M. Epstein, H. Aldridge and Z. H. Aghai** (2016). Temporal Association Between Reflux-like Behaviors and Gastroesophageal Reflux in Preterm and Term Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 62(4): 556-561. doi: 10.1097/mpg.0000000000000968.
- Gagneur, A., Vallet, S., Talbot, P.J., Legrand-Quillien, M.C., Picard, B., Payan, C., Sizun, J.**(2008). Outbreaks of human coronavirus in a pediatric and neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr* 167(12): 1427-1434. doi: 10.1007/s00431-008-0687-0.
- Garami, A., Steiner, A. A., Romanovsky, A. A.** (2018). Fever and hypothermia in systemic inflammation. *Handb Clin Neurol* 157: 565-597. doi: 10.1016/B978-0-444-64074-1.00034-3.
- Garcia, A. J. 3rd., Koschnitzky, J. E., Dashevskiy, T., Ramirez, J. M.** (2013). Cardiorespiratory coupling in health and disease. *Auton Neurosci* 175(1-2): 26-37. doi: 10.1016/j.autneu.2013.02.006.
- Garrido, D., Assioun, J. J., Keshishyan, A., Sanchez-Gonzalez, M. A., Goubran, B.** (2018). Respiratory Rate Variability as a Prognostic Factor in Hospitalized Patients Transferred to the Intensive Care Unit. *Cureus* 10(1): e2100. doi: 10.7759/cureus.2100.
- Gasior, J. S., Sacha, J., Jelen, P. J., Zielinski, J., Przybylski, J.** (2016). Heart Rate and Respiratory Rate Influence on Heart Rate Variability Repeatability: Effects of the Correction for the Prevailing Heart Rate. *Front Physiol* 7: 356. doi: 10.3389/fphys.2016.00356.
- Gauda, E. B., Cristofalo, E., Nunez, J.** (2007). Peripheral arterial chemoreceptors and sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 157(1): 162-170. doi: 10.1016/j.resp.2007.02.016.
- Gresham, K., Boyer, B., Mayer, C., Foglyano, R., Martin, R., Wilson, C. G.** (2011). Airway inflammation and central respiratory control: results from in vivo and in vitro neonatal rat. *Respir Physiol Neurobiol* 178(3): 414-421. doi: 10.1016/j.resp.2011.05.008.
- Griffin, M. P., Lake, D. E., Bissonette, E. A., Harrell, F. E. Jr., O'Shea, T. M., Moorman, J. R.** (2005). Heart rate characteristics: novel physiomarkers to predict neonatal infection and death. *Pediatrics* 116(5): 1070-1074. doi: 10.1542/peds.2004-2461.
- Grondman, I., Pirvu, A., Riza, A., Ioana, M., Netea, M. G.** (2020). Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis. *Biochem Soc Trans* 48(1): 1-14. doi: 10.1042/BST20190029.
- Guyenet, P. G.** (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7(5): 335-346. doi: 10.1038/nrn1902.
- Guyenet, P. G. and D. A. Bayliss.** (2015). Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. *Neuron* 87(5): 946-961. doi: 10.1016/j.neuron.2015.08.001.

Guyton, A. C., Hall, J. E. (2003). Précis de physiologie médicale. *PICCIN* (2^e édition) ISBN-13: 978-8829916573.

Hamilton, G. S., Edwards, B., Solin, P., Walker, A. M. (2006). A model of coronary artery endothelial dysfunction in the sleeping lamb. *Sleep Med* 7(7): 573-579. doi: 10.1016/j.sleep.2006.04.001.

Hayano, J., Yasuma, F. (2003). Hypothesis: respiratory sinus arrhythmia is an intrinsic resting function of cardiopulmonary system. *Cardiovasc Res* 58(1): 1-9. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00851-9.

Hayano, J., Yasuma, F., Okada, A., Mukai, S., Fujinami, T. (1996). Respiratory sinus arrhythmia. A phenomenon improving pulmonary gas exchange and circulatory efficiency. *Circulation* 94(4): 842-847. doi: 10.1161/01.cir.94.4.842.

Herlenius, E. (2011). An inflammatory pathway to apnea and autonomic dysregulation. *Respir Physiol Neurobiol* 178(3): 449-457. doi: 10.1016/j.resp.2011.06.026.

Herry, C. L., Cortes, M. (2016). Temporal Patterns in Sheep Fetal Heart Rate Variability Correlate to Systemic Cytokine Inflammatory Response: A Methodological Exploration of Monitoring Potential Using Complex Signals Bioinformatics. *PLoS One* 11(4): e0153515. doi: 10.1371/journal.pone.0153515.

Hershcovici, T., Mashimo, H., Fass, R. (2011). The lower esophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* 23(9): 819-830. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01738.x.

Ho, C. Y., Gu, Q., Lin, Y. S., Lee, L. Y. (2001). Sensitivity of vagal afferent endings to chemical irritants in the rat lung. *Respir Physiol* 127(2-3): 113-124. doi: 10.1016/s0034-5687(01)00241-9.

Hofstetter, A. O., Legnevall, L., Herlenius, E., Katz-Salamon, M. (2008). Cardiorespiratory development in extremely preterm infants: vulnerability to infection and persistence of events beyond term-equivalent age. *Acta Paediatr* 97(3): 285-292. doi: 10.1111/j.1651-2227.2007.00618.x.

Hofstetter, A. O., Saha, S., Siljehav, V., Jakobsson, P. J., Herlenius, E. (2007). The induced prostaglandin E2 pathway is a key regulator of the respiratory response to infection and hypoxia in neonates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(23): 9894-9899. doi: 10.1073/pnas.0611468104.

Horne, R. S. C. (2019). Sudden infant death syndrome: current perspectives. *Intern Med J* 49(4): 433-438. doi: 10.1111/imj.14248.

Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., Vincent, J. L. (2016). Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16045. doi: 10.1038/nrdp.2016.45.

- Huikuri, H. V., Stein, P. K.** (2013). Heart rate variability in risk stratification of cardiac patients. *Prog Cardiovasc Dis* 56(2): 153-159. doi: 10.1016/j.pcad.2013.07.003.
- Ishikawa, T., Sekizawa, S. I., Sant'Ambrogio, G., Sant'Ambrogio, F. B.** (1999). Larynx vs. esophagus as reflexogenic sites for acid-induced bronchoconstriction in dogs. *J Appl Physiol* (1985) 86(4): 1226-1230. doi: 10.1152/jappl.1999.86.4.1226.
- Izumizaki, M., Pokorski, M., Homma, I.** (2004). Role of the carotid bodies in chemosensory ventilatory responses in the anesthetized mouse. *J Appl Physiol* 97(4): 1401-1407. doi: 10.1152/japplphysiol.00025.2004.
- Jadcherla, S. R.** (2006). Upstream effect of esophageal distention: effect on airway. *Curr Gastroenterol Rep* 8(3): 190-194. doi: 10.1007/s11894-006-0074-9.
- Jadcherla, S. R.** (2012). Pathophysiology of aerodigestive pulmonary disorders in the neonate. *Clin Perinatol* 39(3): 639-654. doi: 10.1016/j.clp.2012.06.005.
- Jadcherla, S. R., Duong, H. Q., Hoffmann, R. G., Shaker, R.** (2003). Esophageal body and upper esophageal sphincter motor responses to esophageal provocation during maturation in preterm newborns. *J Pediatr* 143(1): 31-38. doi: 10.1016/s0022-3476(03)00242-7.
- Jadcherla, S. R., Gupta, A., Coley, B. D., Fernandez, S., Shaker, R.** (2007). Esophago-glottal closure reflex in human infants: a novel reflex elicited with concurrent manometry and ultrasonography. *The American journal of gastroenterology* 102(10): 2286-2293. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01401.x.
- Jadcherla, S. R., Hoffmann, R. G., Shaker, R.** (2006). Effect of maturation of the magnitude of mechanosensitive and chemosensitive reflexes in the premature human esophagus. *J Pediatr* 149(1): 77-82. doi: 10.1016/j.jpeds.2006.02.041.
- Jadcherla, S. R., Parks, V. N., Peng, J., Dzodzomenyo, S., Fernandez, S., Shaker, R., Splaingard, M.** (2012). Esophageal sensation in premature human neonates: temporal relationships and implications of aerodigestive reflexes and electrocortical arousals. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(1): G134-144. doi: 10.1152/ajpgi.00067.2011.
- Jeffery, H. E., Page, M., Post, E. J., Wood, A. K.** (1995). Physiological studies of gastro-oesophageal reflux and airway protective responses in the young animal and human infant. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22(8): 544-549. doi: 10.1111/j.1440-1681.1995.tb02064.x.
- Jonker, S. S., Zhang, L., Louey, S., Giraud, G. D., Thornburg, K. L., Faber, J. J.** (2007). Myocyte enlargement, differentiation, and proliferation kinetics in the fetal sheep heart. *J Appl Physiol* (1985) 102(3): 1130-1142. doi: 10.1152/japplphysiol.00937.2006.
- Joshi, R., Kommers, D., Oosterwijk, L., Feijs, L., Van Pul, C., Andriessen, P.** (2019). Predicting Neonatal Sepsis Using Features of Heart Rate Variability, Respiratory

Characteristics and ECG-Derived Estimates of Infant Motion. *IEEE J Biomed Health Inform* 24(3): 681-692. doi: 10.1109/JBHI.2019.2927463.

Julius, D., Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413(6852): 203-210. doi: 10.1038/35093019.

Kapsimalis, F., Richardson, G., Opp, M. R., Kryger, M. (2005). Cytokines and normal sleep. *Curr Opin Pulm Med* 11(6): 481-484. doi: 10.1097/01.mcp.0000183062.98665.6b.

Katz, E. S. (2012). Chapter 34 - Disorders of Central Respiratory Control During Sleep in Children in *Therapie in Sleep Medicine* pp. 434-447. doi <https://doi.org/10.1016/C2009-0-40426-4>. ISBN 978-1-4377-1703-7.

Kaur, M., Chandran, D.S., Jaryal, A.K., Bhowmik, D., Agarwal, S.K., Deepak, K.K. (2016). Baroreflex dysfunction in chronic kidney disease. *World J Nephrol.* 5(1): 53-65. doi:10.5527/wjn.v5.i1.53.

Kawasaki, T. and T. Kawai (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5: 461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.

Kenigsberg, K., Griswold, P.G., Buckley, B.J., Gootman, N., Gootman, P.M. (1983). Cardiac effects of esophageal stimulation: possible relationship between gastroesophageal reflux (GER) and sudden infant death syndrome (SIDS). *J Pediatr Surg* 18: 542-545. doi:10.1016/S0022-3468(83)80355-8.

Kenney, M. J., Ganta, C. K. (2014). Autonomic nervous system and immune system interactions. *Compr Physiol* 4(3): 1177-1200. doi: 10.1002/cphy.c130051.

Kerste, M., Corver, J., Sonneveld, M. C., van Brakel, M., van der Linden, P. D., M, Braams-LLisman, BA, Plotz, F. B. (2016). Application of sepsis calculator in newborns with suspected infection. *J Matern Fetal Neonatal Med* 29(23): 3860-3865.

Kinkead, R., Schlenker, E. (2017). Sex-based differences in respiratory control: Progress in basic physiology and clinical research. *Respir Physiol Neurobiol.* 245: 1-3. doi:10.1016/j.resp.2017.08.013.

Krueger, J. M. and M. R. Opp. (2016). Sleep and Microbes. *Int Rev Neurobiol* 131: 207-225. doi: 10.3109/14767058.2016.1149563.

Kumar, N., Akangire, G., Sullivan, B., Fairchild, K., Sampath, V. (2020). Continuous vital sign analysis for predicting and preventing neonatal diseases in the twenty-first century: big data to the forefront. *Pediatr Res* 87(2): 210-220. doi:10.1038/s41390-019-0527-0.

Kuo, B., Urma, D. (2006). Esophagus - anatomy and development. *GI Motility online.* doi:10.1038/gimo6.

- Lacasa, L., Luque, B., Ballesteros, F., Luque, J., Nuno, J. C.** (2008). From time series to complex networks: the visibility graph. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(13): 4972-4975. doi: 10.1073/pnas.0709247105.
- Lang, I. M., Haworth, S. T., Medda, B. K., Forster, H., Shaker, R.** (2016). Mechanisms of airway responses to esophageal acidification in cats. *J Appl Physiol* (1985) 120(7): 774-783. doi: 10.1152/jappphysiol.00758.2015.
- Lang, I. M., Haworth, S. T., Medda, B. K., Roerig, D. L., Forster, H. V., Shaker, R.** (2008). Airway responses to esophageal acidification. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(1): R211-219. doi: 10.1152/ajpregu.00394.2007.
- Lang, I. M., Medda, B. K., Shaker, R.** (2001). Mechanisms of reflexes induced by esophageal distension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(5): G1246-1263. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.5.g1246.
- Lang, I. M., Medda, B. K., Shaker, R.** (2011). Differential activation of medullary vagal nuclei caused by stimulation of different esophageal mechanoreceptors. *Brain Res* 1368: 119-133. doi: 10.1016/j.brainres.2010.10.061.
- Lang, I. M., Medda, B. K., Shaker, R.** (2014). Mechanism of UES relaxation initiated by gastric air distension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307(4): G452-458. doi: 10.1152/ajpgi.00120.2014.
- Leiter, J. C., Bohm, I.** (2007). Mechanisms of pathogenesis in the Sudden Infant Death Syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 159(2): 127-138. doi: 10.1016/j.resp.2007.05.014.
- Leon, L. R.** (2004). Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. *Front Biosci* 9: 1877-1888. doi: 10.2741/1381.
- Leung, A. K., Hon, K. L.** (2019). Gastroesophageal reflux in children: an updated review. *Drugs Context* 8: 212591. doi: 10.7573/dic.212591.
- Liang, Y., Zhou, J., Ji, K., Liu, H., Degen, A., Zhai, M., Jiao, D., Guo, J., Zhao, Z., Yang, G.** (2019). Protective Effect of Resveratrol Improves Systemic Inflammation Responses in LPS-Injected Lambs. *Animals (Basel)* 9(11). doi: 10.3390/ani9110872.
- Lightdale, J. R., Gremse, D. A.** (2013). Gastroesophageal Reflux: Management Guidance for the Pediatrician. *Pediatrics* 131(5): e1684-e1695. doi: 10.1542/peds.2013-0421.
- Lindgren, C., Groggaard, J.** (1996). Reflex apnoea response and inflammatory mediators in infants with respiratory tract infection. *Acta Paediatr* 85(7): 798-803. doi: 10.1111/j.1651-2227.1996.tb14154.x.

- Lindgren, C., Lin, J., Graham, B. S., Gray, M. E., Parker, R. A., Sundell, H. W.** (1992). Respiratory syncytial virus infection enhances the response to laryngeal chemostimulation and inhibits arousal from sleep in young lambs. *Acta Paediatr* 85(7): 789-797. doi: 10.1111/j.1651-2227.1996.tb14153.x.
- Loomis, C. W., Yao, D., Bieger, D.** (1997). Characterization of an esophagocardiovascular reflex in the rat. *Am J Physiol* 272(6 Pt 2): r1783-1791. doi: 10.1152/ajpregu.1997.272.6.r1783.
- Madl, T.** (2016). Network analysis of heart beat intervals using horizontal visibility graphs. *2016 Computing in Cardiology Conference (CinC)*, IEEE. doi: 10.22489/cinc.2016.213-510.
- Magagnin, V., Bassani, T., Bari, V., Turiel, M., Maestri, R., Pinna, G. D., Porta, A.** (2011). Non-stationarities significantly distort short-term spectral, symbolic and entropy heart rate variability indices. *Physiol Meas* 32(11): 1775-1786. doi: 10.1088/0967-3334/32/11/S05.
- Mansfield, L. E.** (2001). Embryonic origins of the relation of gastroesophageal reflux disease and airway disease. *Am J Med* 111 Suppl 8A: 3s-7s. doi: 10.1016/s0002-9343(01)00846-4.
- Mayr, F. B., Yende, S., Angus, D. C.** (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5(1): 4-11. doi: 10.4161/viru.27372.
- McClure, L., O'Connor, A. E., Hayward, S., Jenkin, G., Walker, D. W., Phillips, D. J.** (2005). Effects of age and pregnancy on the circulatory activin response of sheep to acute inflammatory challenge by lipopolysaccharide. *J Endocrinol* 185(1): 139-149. doi: 10.1677/joe.1.06051.
- McDeigan, G. E., Ladino, J., Hehre, D., Devia, C., Bancalari, E., Suguihara, C.** (2003). The effect of Escherichia coli endotoxin infusion on the ventilatory response to hypoxia in unanesthetized newborn piglets. *Pediatr Res* 53(6): 950-955. doi: 10.1203/01.pdr.0000064581.94126.1c.
- McDonald, F. B., Chandrasekharan, K., Wilson, R. J., Hasan, S. U.** (2016a). Cardiorespiratory control and cytokine profile in response to heat stress, hypoxia, and lipopolysaccharide (LPS) exposure during early neonatal period. *Physiol Rep* 4(2). doi: 10.14814/phy2.12688.
- McDonald, F. B., Chandrasekharan, K., Wilson, R. J., Hasan, S. U.** (2016b). Interactive effects of maternal cigarette smoke, heat stress, hypoxia, and lipopolysaccharide on neonatal cardiorespiratory and cytokine responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 311(6): R1113-r1124. doi: 10.1152/ajpregu.00062.2016.
- McDonald, F. B., Dempsey, E. M., O'Halloran, K. D.** (2019). The impact of preterm adversity on cardiorespiratory function. *Exp Physiol*. doi: 10.1113/EP087490.

- McDonald, F. B., A. M. Khawaja, A. A. Imran, M. E. Ellis, K. Chandrasekharan and S. U. Hasan** (2017). Thermal and cytokine responses to endotoxin challenge during early life. *Can J Physiol Pharmacol* 95(12): 1488-1492. doi: 10.1139/cjpp-2017-0167.
- McKelvey, G. M., Post, E. J., Wood, A. K., Jeffery, H. E.** (2001). Airway protection following simulated gastro-oesophageal reflux in sedated and sleeping neonatal piglets during active sleep. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(7): 533-539. doi: 10.1046/j.1440-1681.2001.03483.x.
- McKendrick, N., Drucker, D. B., Morris, J. A., Telford, D. R., Barson, A. J., Oppenheim, B. A., Crawley, B. A., Gibbs, A.** (1992). Bacterial toxins: a possible cause of cot death. *J Clin Pathol* 45(1): 49-53. doi: 10.1136/jcp.45.1.49.
- Mittal, R. K., Holloway, R. H., Penagini, R., Blackshaw, L. A., Dent, J.** (1995). Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology* 109(2): 601-610. doi: 10.1016/0016-5085(95)90351-8.
- Monteau, R., Hilaire, G.** (1991). Spinal respiratory motoneurons. *Prog Neurobiol* 37(2): 83-144. doi: 10.1016/0301-0082(91)90024-u.
- Moon, R. Y., Horne, R. S., Hauck, F. R.** (2007). Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370(9598): 1578-1587. doi: 10.1016/s0140-6736(07)61662-6.
- Moorman, J. R., Carlo, W. A., Kattwinkel, J., Schelonka, R. L., Porcelli, P. J., Navarrete, C. T., Bancalari, E., Aschner, J. L., Whit Walker, M., Perez, J. A., Palmer, C., Stukenborg, G. J., Lake, D. E., Michael O'Shea, T.** (2011). Mortality reduction by heart rate characteristic monitoring in very low birth weight neonates: a randomized trial. *J Pediatr* 159(6): 900-906.e901. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.06.044.
- Morschel, M., Dutschmann, M.** (2009). Pontine respiratory activity involved in inspiratory/expiratory phase transition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1529): 2517-2526. doi: 10.1098/rstb.2009.0074.
- Moscovis, S. M., Gordon, A. E., Al Madani, O. M., Gleeson, M., Scott, R. J., Hall, S. T., Burns, C., Blackwell, C.** (2015). Virus Infections and Sudden Death in Infancy: The Role of Interferon-gamma. *Front Immunol* 6: 107. doi: 10.3389/fimmu.2015.00107.
- Mousa, H., Woodley, F. W., Metheney, M., Hayes, J.** (2005). Testing the association between gastroesophageal reflux and apnea in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 41(2): 169-177. doi: 10.1097/01.mpg.0000173603.77388.84.
- Mukherjee, R., McQuinn, T. C., Dugan, M. A., Saul, J. P., Spinale, F. G.** (2010). Cardiac function and circulating cytokines after endotoxin exposure in neonatal mice. *Pediatr Res* 68(5): 381-386. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181efbe10.

Mullington, J., Korth, C., Hermann, D. M., Orth, A., Galanos, C., Holsboer, F., Pollmacher, T. (2000). Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(4): R947-955. doi: 10.1152/ajpregu.2000.278.4.r947.

Nault, M. A., Vincent, S. G., Fisher, J. T. (1999). Mechanisms of capsaicin- and lactic acid-induced bronchoconstriction in the newborn dog. *J Physiol.* 515(Pt 2) : 567-578. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.567ac.x.

Nault, S., Samson, N., Nadeau, C., Djeddi, D., Praud, J. P. (2017). Reflex cardiorespiratory events from esophageal origin are heightened by preterm birth. *J Appl Physiol (1985)* 123(2): 489-497. doi: 10.1152/jappphysiol.00915.2016.

Ng, S., Strunk, T., Jiang, P., Muk, T., Sangild, P. T., Currie, A. (2018). Precision Medicine for Neonatal Sepsis. *Front Mol Biosci* 5: 70. doi: 10.3389/fmolb.2018.00070.

Nguyen, N., Vandenbroucke, L., Hernandez, A., Pham, T., Beuchee, A., Pladys, P. (2017). Early-onset neonatal sepsis is associated with a high heart rate during automatically selected stationary periods. *Acta Paediatr* 106(5): 749-754. doi: 10.1111/apa.13782.

Nobile, S., P. Marchionni, C. Noviello and V. P. Carnielli. (2019). Correlation between cardiorespiratory events and gastro-esophageal reflux in preterm and term infants: Analysis of predisposing factors. *Early Hum Dev* 134: 14-18. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2019.05.003.

Norheim, K. B., Jonsson, G., Omdal, R. (2011). Biological mechanisms of chronic fatigue. *Rheumatology (Oxford)* 50(6): 1009-1018. doi: 10.1093/rheumatology/keq454.

Nunez, J., Cristofalo, E., McGinley, B., Katz, R., Glen, D. R., Gauda, E. (2011). Temporal association of polysomnographic cardiorespiratory events with GER detected by MII-pH probe in the premature infant at term. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 52(5): 523-531. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181fa06d7.

Olsson, A., Kayhan, G., Lagercrantz, H., Herlenius, E. (2003). IL-1 beta depresses respiration and anoxic survival via a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats. *Pediatr Res* 54(3): 326-331. doi: 10.1203/01.pdr.0000076665.62641.a2.

Osmakov, D. I., Andreev, Y. A., Kozlov, S. A. (2014). Acid-sensing ion channels and their modulators. *Biochemistry (Mosc)* 79(13): 1528-1545. doi: 10.1134/S0006297914130069.

Pal, G. K., Adithan, C., Ananthanarayanan, P. H., Pal, P., Nanda, N., Thiyagarajan, D., Syamsunderkiran, A. N., Lalitha, V., Dutta, T. K. (2013). Association of sympathovagal imbalance with cardiovascular risks in young prehypertensives. *Am J Cardiol* 112(11): 1757-1762. doi: 10.1016/j.amjcard.2013.07.040.

Pan, L. G., Forster, H.V., Ohtake, P.J., Lowry, T.F., Korducki, M.J., Forster, A.L. (1995). Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing during ventrolateral medullary cooling in goats. *J Appl Physiol* 79(4): 1120-1128. doi: 10.1152/jappl.1995.79.4.1120.

Pascual-Font, A., Hernandez-Morato, I., McHanwell, S., Vazquez, T., Maranillo, E., Sanudo, J., Valderrama-Canales, F. J. (2011). The central projections of the laryngeal nerves in the rat. *J Anat* 219(2): 217-228. doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01390.x.

Paterson, W. G. (2001). Extraesophageal manifestations of reflux disease: myths and reality. *Chest Surg Clin N Am* 11(3): 523-538. PMID: 11787964.

Patrinos, M. E. and R. J. Martin. (2017). Apnea in the term infant. *Semin Fetal Neonatal Med* 22(4): 240-244. doi: 10.1016/j.siny.2017.04.003.

Park, B. S., Lee, J.O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 45:e66. doi: 10.1038/emm.2013.97.

Peter, C. S., Sprodowski, N., Bohnhorst, B., Silny, J., Poets, C. F. (2002). Gastroesophageal reflux and apnea of prematurity: no temporal relationship. *Pediatrics* 109(1): 8-11. doi: 10.1542/peds.109.1.8.

Pickens, D.L., Schefft, G., Thach, B.T. (1988). Prolonged apnea associated with upper airway protective reflexes in apnea of prematurity. *Am Rev Respir Dis* 137(1) :113–118. doi: 10.1164/ajrccm/137.1.113.

Pickens, D.L., Schefft, G.L., Storch, G.A., Thach, B.T. (1989). Characterization of prolonged apneic episodes associated with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Pulmonol* 6(3): 195–201. doi: 10.1002/ppul.1950060314.

Pickering, M., Campion, D., Jones, J. F. (2002). Reflex cardiorespiratory effects of nociceptive oesophageal distension in the decerebrate rat. *Exp Physiol* 87(1): 41-48. doi: 10.1113/eph8702241.

Pladys, P., Vandenbroucke, L., Hernández, A., Beuchée, A. (2014). Intérêt des mesures de variabilité du rythme cardiaque dans le sepsis. *Réanimation* 24: S315-S321. doi: 10.1007/s13546-014-1013-7.

Poets, C. F., Brockmann, P. E. (2011). Myth: gastroesophageal reflux is a pathological entity in the preterm infant. *Semin Fetal Neonatal Med* 16(5): 259-263. doi: 10.1016/j.siny.2011.05.001.

Poets, C. F., Stebbens, V. A., Samuels, M. P., Southall, D. P. (1993). The relationship between bradycardia, apnea, and hypoxemia in preterm infants. *Pediatr Res* 34(2): 144-147. doi: 10.1203/00006450-199308000-00007

Poon, C. S., Song, G. (2014). Bidirectional plasticity of pontine pneumotaxic postinspiratory drive: implication for a pontomedullary respiratory central pattern generator. *Prog Brain Res* 209: 235-254. doi: 10.1016/B978-0-444-63274-6.00012-6.

Praud, J. P. (2010). Upper airway reflexes in response to gastric reflux. *Paediatr Respir Rev* 11(4): 208-212. doi: 10.1016/j.prrv.2010.07.001.

Praud, J. P., St-Hilaire, M., Dorion, D. (2008). [Laryngeal chemoreflexes and cardiorespiratory control in the neonatal period]. *Arch Pediatr* 15(5): 620-622. doi: 10.1016/S0929-693X(08)71853-0.

Quinn, J. A., Munoz, F. M., Gonik, B., Frau, L., Cutland, C., Mallett-Moore, T., Kissou, A., Wittke, F., Das, M., Nunes, T., Pye, S., Watson, W., Ramos, A. A., Cordero, J. F., Huang, W. T., Kochhar, S., Buttery, J., & Brighton Collaboration Preterm Birth Working Group (2016). Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine* 34(49): 6047–6056. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.045.

Qureshi, A., Malkar, M., Splaingard, M., Khuhro, A., Jadcherla, S. (2015). The Role of Sleep in the Modulation of Gastroesophageal Reflux and Symptoms in NICU Neonates. *Pediatr Neurol* 53(3): 226-232. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2015.05.012.

Ralston, S., Hill, V. (2009) Incidence of apnea in infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis : a systematic review. *J Pediatr.* 155(5): 728-733. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.04.063.

Rambaud, C., Guibert, M., Briand, E., Grangeot-Keros, L., Coulomb-L'Hermine, A., Dehan, M. (1999). Microbiology in sudden infant death syndrome (SIDS) and other childhood deaths. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25(1-2): 59-66. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01327.x.

Ramet, J. (1994). Cardiac and respiratory reactivity to gastroesophageal reflux: experimental data in infants. *Biol Neonate* 65(3-4): 240-246. doi: 10.1159/000244059.

Ramet, J., Praud, J. P., d'Allest, A. M., Dehan, M., Guilleminault, C., Gaultier, C. (1990). Cardiac and respiratory responses to esophageal dilatation during REM sleep in human infants. *Biol Neonate* 58(4): 181-187. doi: 10.1159/000243266.

Raux, M., Fiamma, M. N., Similowski, T., Straus, C. (2007). Contrôle de la ventilation : physiologie et exploration en réanimation. *Réanimation* 16(6): 511-520. doi : 10.1016/j.reaurg.2007.09.008.

Raza, M. W., Blackwell, C. C. (1999). Sudden infant death syndrome, virus infections and cytokines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25(1-2): 85-96. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01330.x.

- Reix, P., M. St-Hilaire and J. P. Praud** (2007). Laryngeal sensitivity in the neonatal period: from bench to bedside. *Pediatr Pulmonol* 42(8): 674-682. doi: 10.1002/ppul.20645.
- Rodman, J.R., Curran, A.K., Henderson, K.S., Dempsey, J.A., Smith, CA.** (2001). Carotid body denervation in dogs: eupnea and the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. *J Appl Physiol* 91(1): 328-335. doi: 10.1152/jappl.2001.91.1.328.
- Rogers, C. S., Abraham, W. M., Brogden, K. A., Engelhardt, J. F., Fisher, J. T., McCray, P. B., Jr, McLennan, G., Meyerholz, D. K., Namati, E., Ostedgaard, L. S., Prather, R. S., Sabater, J. R., Stoltz, D. A., Zabner, J., & Welsh, M. J.** (2008). The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 295(2): L240–L263. doi: 10.1152/ajplung.90203.2008.
- Rosenbaum, T. and S. A. Simon** (2007). TRPV1 Receptors and Signal Transduction. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. *Frontiers in Neuroscience* chapter 5.
- Roth, J., Blatteis, C. M.** (2014). Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol* 4(4): 1563-1604. doi: 10.1002/cphy.c130033.
- Rudd, B. D., Burstein, E., Duckett, C. S., Li, X., Lukacs, N. W.** (2005). Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J Virol* 79(6): 3350-3357. doi: 10.1128/JVI.79.6.3350-3357.2005.
- Salvatore, S., Arrigo, S., Luini, C., Vandenplas, Y.** (2010). Esophageal impedance in children: symptom-based results. *J Pediatr* 157(6): 949-954.e941-942. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.07.029.
- Salvesen, Ø., Reiten, M. R., Espenes, A., Bakkebo, M. K., Tranulis, M. A., Ersdal, C.** (2017). LPS-induced systemic inflammation reveals an immunomodulatory role for the prion protein at the blood-brain interface. *Journal of neuroinflammation* 14(1): 106-106. doi: 10.1186/s12974-017-0879-5.
- Samanta, A., Hughes, T. E. T., Moiseenkova-Bell, V. Y.** (2018). Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem* 87: 141-165. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_6.
- Samson, N., Fortin-Pellerin, E., Praud, JP.** (2018). The contribution of ovine models to perinatal respiratory physiology. *Front Biosci (Landmark ED)* 23: 1195-1219. doi: 10.2741/4639.
- Savich, R. D., Guerra, F. A., Lee, C. C., Kitterman, J. A.** (1995). Prostaglandin E2 decreases fetal breathing movements, but not pulmonary blood flow, in fetal sheep. *J Appl Physiol* (1985) 78(4): 1477-1484. doi: 10.1152/jappl.1995.78.4.1477.

Schey, W. L., Meus, P., Levinsky, R. A., Campbell, C., Replogle, R. (1981a). Esophageal dysmotility and the sudden infant death syndrome: experimental observations of neonatal puppies. *Radiology* 140(1): 73-77. doi: 10.1148/radiology.140.1.7244245.

Schey, W. L., Replogle, R., Campbell, C., Meus, P., Levinsky, R. A. (1981b). Esophageal dysmotility and the sudden infant death syndrome: clinical experience. *Radiology* 140(1): 67-71. doi: 10.1148/radiology.140.1.6787662

Schroeder, A. R., Mansbach, J. M., Stevenson, M., Macias, C. G., Fisher, E. S., Barcega, B., Sullivan, A. F., Espinola, J. A., Piedra, P. A., Camargo, C. A. Jr. (2013). Apnea in children hospitalized with bronchiolitis. *Pediatrics* 132(5): e1194-1201. doi: 10.1542/peds.2013-1501.

Seely, A. J., Bravi, A., Herry, C., Green, G., Longtin, A., Ramsay, T., Fergusson, D., McIntyre, L., Kubelik, D., Maziak, D. E., Ferguson, N., Brown, S. M., Mehta, S., Martin, C., Rubinfeld, G., Jacono, F. J., Clifford, G., Fazekas, A., Marshall J. (2014). Do heart and respiratory rate variability improve prediction of extubation outcomes in critically ill patients? *Crit Care* 18(2): R65. doi: 10.1186/cc13822.

Seely, A. J., Macklem, P. T. (2004). Complex systems and the technology of variability analysis. *Crit Care* 8(6): R367-384. doi: 10.1186/cc2948.

Sengupta, J. N. (2000). An overview of esophageal sensory receptors. *Am J Med* 108 Suppl 4a: 87s-89s. doi: 10.1016/s0002-9343(99)00344-7.

Shaffer, E. A., Thomson, A. B. R. (2005). Principes fondamentaux de gastro-entérologie : états pathologiques et démarches thérapeutiques. *Janssen-Ortho Inc* (5^e édition). ISBN 0-88661-434-1.

Shaffer, F., Venner, J. (2013). Heart Rate Variability Anatomy and Physiology. *Biofeedback* 41(1): 13-25.

Shaker, R., Ren, J., Medda, B., Lang, I., Cowles, V., Jaradeh, S. (1994). Identification and characterization of the esophagoglottal closure reflex in a feline model. *Am J Physiol* 266(1 Pt 1): G147-153. doi: 10.1152/ajpgi.1994.266.1.G147.

Shane, A. L., Sanchez, P. J., Stoll, B. J. (2017). Neonatal sepsis. *Lancet* 390(10104): 1770-1780. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.

Siljehav, V., Hofstetter, A. M., Leifsdottir, K., Herlenius, E. (2015). Prostaglandin E2 Mediates Cardiorespiratory Disturbances during Infection in Neonates. *J Pediatr* 167(6): 1207-1213.e1203. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.08.053.

Siljehav, V., Olsson Hofstetter, A., Jakobsson, P. J., Herlenius, E. (2012). mPGES-1 and prostaglandin E2: vital role in inflammation, hypoxic response, and survival. *Pediatr Res* 72(5): 460-467. doi: 10.1038/pr.2012.119.

Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* 315(8): 801-810. doi: 10.1001/jama.2016.0287.

Slocum, C., Arko, M., Di Fiore, J., Martin, R. J., Hibbs, A. M. (2009). Apnea, bradycardia and desaturation in preterm infants before and after feeding. *J Perinatol* 29(3): 209-212. doi: 10.1038/jp.2008.226.

Slocum, C., Hibbs, A. M., Martin, R. J., Orenstein, S. R. (2007). Infant apnea and gastroesophageal reflux: a critical review and framework for further investigation. *Curr Gastroenterol Rep* 9(3): 219-224. doi: 10.1007/s11894-007-0022-3.

St-Hilaire, M., Duvareille, C., Avoine, O., Carreau, A. M., Samson, N., Micheau, P., Doueik, A., Praud, J. P. (2010). Effects of postnatal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J Appl Physiol* (1985) 109(6): 1820-1826. doi: 10.1152/japplphysiol.01378.2009.

St-Hilaire, M., E. Nsegbe, K. Gagnon-Gervais, N. Samson, F. Moreau-Bussiere, P. H. Fortier and J. P. Praud. (2005). Laryngeal chemoreflexes induced by acid, water, and saline in nonsedated newborn lambs during quiet sleep. *J Appl Physiol* (1985) 98(6): 2197-2203. doi: 10.1152/japplphysiol.01346.2004.

St-Hilaire, M., Samson, N., Duvareille, C., Praud, J. P. (2008). Laryngeal stimulation by an acid solution in the pre-term lamb. *Adv Exp Med Biol* 605: 154-158. doi: 10.1007/978-0-387-73693-8_27.

St-Hilaire, M., Samson, N., Nsegbe, E., Duvareille, C., Moreau-Bussiere, F., Micheau, P., Lebon, J., Praud, J. P. (2007). Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol* (1985) 102(4): 1429-1438. doi: 10.1152/japplphysiol.00977.2006.

StatisticsCanada. (2017). Table 13-10-0395-01. Leading causes of death, infants. from <https://doi.org/10.25318/1310039501-eng>.

Stojanovska, V., Miller, S. L., Hooper, S. B., Polglase, G. R. (2018). The Consequences of Preterm Birth and Chorioamnionitis on Brainstem Respiratory Centers: Implications for Neurochemical Development and Altered Functions by Inflammation and Prostaglandins. *Front Cell Neurosci* 12: 26. doi: 10.3389/fncel.2018.00026.

- Stoll, B. J., Hansen, N. L., Adams-Chapman, I., Fanaroff, A. A., Hintz, S. R., Vohr, B., Higgins, R. D.** (2004). Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA* 292(19): 2357-65. doi: 10.1001/jama.292.19.2357.
- Stoltenberg, L., Sundar, T., Almaas, R., Storm, H., Rognum, T. O., Saugstad, O. D.** (1994). Changes in apnea and autoresuscitation in piglets after intravenous and intrathecal interleukin-1 beta injection. *J Perinat Med* 22(5): 421-432. doi: 10.1515/jpme.1994.22.5.421.
- Sullivan, J. S., Sundaram, S. S.** (2012). Gastroesophageal reflux. *Pediatr Rev* 33(6): 243-254. doi: <https://doi.org/10.1542/pir.33-6-243>.
- Takeda, K., Akira, S.** (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16(1): 3-9. doi: 10.1016/j.smim.2003.10.003.
- Takeda, K., Akira, S.** (2015). Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* 109: 14.12.11-14.12.10. doi: 10.1002/0471142735.im1412s109.
- Takeuchi, Y., Kikusui, T., Kizumi, O., Ohnishi, H., Mori, Y.** (1997). Pathophysiological changes evoked by lipopolysaccharide administration in goats. *J Vet Med Sci* 59(2): 125-127. doi: 10.1292/jvms.59.125.
- TaskForce.** (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 93(5): 1043-1065. PMID: 8598068.
- Thach, B. T.** (1997). Reflux associated apnea in infants: evidence for a laryngeal chemoreflex. *Am J Med* 103(5A): 120S-124S. doi: 10.1016/s0002-9343(97)00336-7.
- Thach, B. T.** (2001). Maturation and transformation of reflexes that protect the laryngeal airway from liquid aspiration from fetal to adult life. *Am J Med* 111 Suppl 8A: 69s-77s. doi: 10.1016/s0002-9343(01)00860-9.
- Thach, B.T.** (2008). Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants. *J Appl Physiol* 104(6): 1828-1834. doi: 10.1152/japplphysiol.01288.2007.
- Thach, B. T., Menon, A.** (1985). Pulmonary protective mechanisms in human infants. *Am Rev Respir Dis* 131(5): S55-58. doi: 10.1164/arrd.1985.131.s5.s55.
- Thayer, J. F., Loerbroks, A., Sternberg, E. M.** (2011). Inflammation and cardiorespiratory control: the role of the vagus nerve. *Respir Physiol Neurobiol* 178(3): 387-394. doi: 10.1016/j.resp.2011.05.016.

- Thomas, G. D.** (2011). Neural control of the circulation. *Adv Physiol Educ* 35(1): 28-32. doi: 10.1152/advan.00114.2010.
- Tracey, K. J.** (2002). The inflammatory reflex. *Nature* 420(6917): 853-859. doi: 10.1038/nature01321.
- Triedman, J. K., Cohen, R. J., Saul, J. P.** (1993). Mild hypovolemic stress alters autonomic modulation of heart rate. *Hypertension* 21(2): 236-247. doi: 10.1161/01.hyp.21.2.236.
- Tuchman, D. N., Boyle, J. T., Pack, A. I., Schwartz, J., Kokonos, M., Spitzer, A. R., Cohen, S.** (1984). Comparison of airway responses following tracheal or esophageal acidification in the cat. *Gastroenterology* 87(4): 872-881. PMID: 6468875.
- Vadhan, J., Tadi, P.** (2020). Physiology, Herring Breuer Reflex. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 31869189.
- Van de Louw, A., Médigue, C., Cottin, F.** (2011). Interrelations entre ventilation mécanique et système nerveux autonome. *Réanimation* 20(2): 105-111. <https://doi.org/10.1007/s13546-011-0218-2>.
- Vassort, G., Fauconnier, J.** (2008). [Transient receptor potential, TRP channels: a new family of channels broadly expressed]. *Med Sci (Paris)* 24(2): 163-168. doi: 10.1051/medsci/2008242163.
- Vogel, J. P., Chawanpaiboon, S., Moller, A. B., Watananirun, K., Bonet, M., Lumbiganon, P.** (2018). The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 52: 3-12. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003.
- Wang, H. M., Bodenstein, M., Markstaller, K.** (2008). Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res* 40(4): 305-316. doi: 10.1159/000121471.
- Wenzl, T. G., Schenke, S., Peschgens, T., Silny, J., Heimann, G., Skopnik, H.** (2001). Association of apnea and nonacid gastroesophageal reflux in infants: Investigations with the intraluminal impedance technique. *Pediatr Pulmonol* 31(2): 144-149. doi: 10.1002/1099-0496(200102)31:2<144::aid-ppul1023>3.0.co;2-z.
- Weusten, B. L., Akkermans, L. M., vanBerge-Henegouwen, G. P., Smout, A. J.** (1995). Symptom perception in gastroesophageal reflux disease is dependent on spatiotemporal reflux characteristics. *Gastroenterology* 108(6): 1739-1744. doi: 10.1016/0016-5085(95)90135-3.
- World Health Organization (WHO)** (2019). Maternal, newborn, child and adolescent health, from http://www.who.int/maternal_child_adolescent/newborns/management_illness_complications/en/.

- Woodland, P., Aktar, R., Mthunzi, E., Lee, C., Peiris, M., Preston, S. L., Blackshaw, L. A.** (2015). Distinct afferent innervation patterns within the human proximal and distal esophageal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308(6): G525-531. doi: 10.1152/ajpgi.00175.2014.
- Wu, I. H., Tsai, M. H., Lai, M. Y., Hsu, L. F., Chiang, M. C., Lien, R., Fu, R. H., Huang, H. R., Chu, S. M., Hsu, J. F.** (2017). Incidence, clinical features, and implications on outcomes of neonatal late-onset sepsis with concurrent infectious focus. *BMC Infect Dis* 17(1): 465. doi: 10.1186/s12879-017-2574-7.
- Xia, L., Damon, T., Leiter, J. C., Bartlett, D. Jr.** (2008). Elevated body temperature exaggerates laryngeal chemoreflex apnea in decerebrate piglets. *Adv Exp Med Biol* 605: 249-254. doi: 10.1007/978-0-387-73693-8_44.
- Yang, L., Seki, E.** (2012). Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Front Physiol* 3: 138. doi: 10.3389/fphys.2012.00138.
- Ye, F., Hatahet, M., Youniss, M. A., Toklu, H. Z., Mazza, J. J., Yale, S.** (2018). The Clinical Significance of Relative Bradycardia. *Wmj* 117(2): 73-78. PMID: 30048576.
- Zhao, J., Gonzalez, F., Mu, D.** (2011). Apnea of prematurity: from cause to treatment. *Eur J Pediatr* 170(9): 1097-1105. doi: 10.1007/s00431-011-1409-6.
- Zielinski, M. R., Krueger, J. M.** (2011). Sleep and innate immunity. *Frontiers in bioscience (Schol Ed)* 3: 632-642. doi: 10.2741/s176.
- Zoetis T, Hurtt ME.** (2003). Species comparison of lung development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 68(2): 121-124. doi:10.1002/bdrb.10014.
- Zulfiqar, U., Jurivich, D. A., Gao, W., Singer, D. H.** (2010). Relation of high heart rate variability to healthy longevity. *Am J Cardiol* 105(8): 1181-1185. doi: 10.1016/j.amjcard.2009.12.022.

ANNEXES

ANNEXES

Article 3. Cardiorespiratory alterations in a newborn ovine model of systemic inflammation induced by polyinosinic: polycytidylic acid injection

1.1. Avant-propos

Auteurs : Stéphanie Nault, Vincent Creuze, Sally Al-Omar, Roqaya Imane, Charlène Nadeau, Nathalie Samson, Sophie Tremblay, Guy Carrault, Patrick Pladys, Jean-Paul Praud

Statut de l'article : En cours de rédaction.

Journal visé: *Pediatric Research*, 2020

Contributions : J'ai participé à toutes les étapes menant à la rédaction de cet article, incluant l'élaboration du protocole de recherche, la mise au point du modèle animal, les chirurgies, les enregistrements polysomnographiques, l'analyse des données, la préparation des figures et tableaux et l'écriture du manuscrit sous la supervision de mon directeur de recherche.

1.2. Résumé de l'article 3

Il est connu que les virus respiratoires peuvent être à l'origine d'apnées et de bradycardies cliniquement sévères durant les premières semaines de vie chez les nouveau-nés prématurés et à terme. La reconnaissance de l'origine d'un sepsis est un défi majeur pour les néonatalogistes puisqu'aucun marqueur idéal n'a été identifié à ce jour et que les manifestations cliniques sont non spécifiques et très similaires lors d'un LOS d'origine bactérienne ou virale. De plus, on connaît très peu de choses en ce qui a trait à l'inflammation systémique lors d'un sepsis viral et ces conséquences sur le contrôle cardiorespiratoire. L'objectif principal de cette étude était de caractériser ces altérations en mettant en place un modèle néonatal d'inflammation systémique *via* l'injection de Poly I:C. L'objectif secondaire était d'évaluer le degré d'inflammation au niveau du tronc cérébral. Deux polysomnographies de 6 heures ont été réalisées sur deux jours consécutifs chez des agneaux à terme (n = 8). La première polysomnographie a été effectuée après une injection IV de solution saline (condition contrôle) alors que la seconde a été effectuée après une injection IV de 300 µg / kg de Poly I:C. La température rectale, l'activité locomotrice, les stades de conscience, les gaz du sang artériel, la fréquence respiratoire et la fréquence cardiaque, la pression artérielle systémique moyenne, les apnées et les ralentissements cardiaques, ainsi que la variabilité des fréquences cardiaque et respiratoire ont été évalués pendant 6 heures. Les résultats ont montré que l'injection de Poly I:C a entraîné une augmentation biphasique de la température rectale et une augmentation du sommeil NREM en plus d'une diminution de la mobilité et de l'éveil agité. Aussi, une augmentation biphasique de la FC et une diminution globale de la VFC ont été observées après l'injection de Poly I:C. Finalement, les résultats préliminaires prouvent que l'inflammation du tronc cérébral (expression accrue de l'ARNm d'IL-8, IL-6, TNF- α et Caspase-3) est présente 6 heures après l'injection de Poly I:C. Pour l'instant, nous n'avons cependant trouvé aucune caractéristique permettant aux cliniciens de différencier l'origine d'un sepsis.

1.3. Article 3

Cardiorespiratory alterations in a newborn ovine model of systemic inflammation induced by polyinosinic: polycytidylic acid injection

Stéphanie Nault,¹ Vincent Creuze,² Sally Al-Omar,¹ Roqaya Imane,³ Charlène Nadeau,¹ Nathalie Samson,¹ Sophie Tremblay,³ Guy Carrault,⁴ Patrick Pladys,⁴ and Jean-Paul Praud^{1*}

¹Neonatal Respiratory Research Unit, Departments of Pediatrics and Pharmacology-Physiology, Université de Sherbrooke, QC, Canada

²Department of LIRMM, Université de Montpellier, CNRS, France

³Departments of Neurosciences and Pediatrics, CHU Sainte-Justine Research Center, Faculty of Medicine, Université de Montréal, QC, Canada

⁴ Inserm, LTSI – UMR 1099, F-35000, Université Rennes 1, CHU Rennes, Rennes, France.

*** Correspondence:**

Jean-Paul Praud MD PhD
Departments of Pediatrics and Physiology
QC, Canada, J1H 5N4

Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca
Université de Sherbrooke
Phone: (819) 346-1110, ext 73147

Keywords: Polyinosinic: polycytidylic acid, neonatal sepsis, cardiorespiratory control, heart-rate variability, respiratory-rate variability.

Funding: Patrick Pladys received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement no. 689260 (Digi-NewB project). Sophie Tremblay received funding from the Scottish Rite Charitable Foundation of Canada and the Canadian Institutes of Health Research. Jean-Paul Praud received funding from the Canada Research Chair in Neonatal Respiratory Physiology and is a member of the University of Sherbrooke Hospital Research Center.

ABSTRACT

Respiratory viruses can be responsible for severe apneas and bradycardias in the first weeks of life in preterm and full-term infants. Even if challenging for clinicians, early recognition of viral sepsis is of high importance to prevent the use of antibacterial treatment, avoid subsequent antibacterial resistance and reduced length of hospital stay. However, the link between systemic inflammation related to viral sepsis and cardiorespiratory alterations remain poorly understood. The main objective of this study was to characterize these alterations by setting up a full-term newborn lamb model of systemic inflammation using polyinosinic: polycytidylic acid (Poly I:C) injection. Two 6-hour polysomnographic recordings were performed on two consecutive days on eight full-term lambs: the first after an IV saline injection (control condition); the second, after an IV injection of 350 µg/kg Poly I:C (test condition). Rectal temperature, locomotor activity, state of alertness, arterial blood gases, respiratory frequency and heart rate, mean arterial blood pressure, apneas and cardiac decelerations, and heart-rate and respiratory-rate variability (HRV and RRV) were continuously assessed for 6 hours. Poly I:C injection decreased locomotor activity ($p = 0.02$) and active wakefulness ($p = 0.01$), as well as increased NREM sleep ($p = 0.01$) compared to the control condition. In addition, Poly I:C injection led to a biphasic increase in rectal temperature (at ~ 45 and 150 minutes, $p = 0.04$ and $p = 0.03$ respectively) and in heart rate ($p = 0.001$). An overall decrease in HRV was also observed. Lastly, preliminary results provide proof of principle that brainstem inflammation (increased IL-8, IL-6, TNF- α and Caspase-3 mRNA expression) is present in the region of the rostral ventrolateral medulla 6 hours after Poly I:C injection. Overall, we did not however find any features allowing clinicians differentiate viral from bacterial sepsis. In conclusion, this full-term lamb model of systemic inflammation reproduces several important aspects of neonatal viral sepsis and paves the way for studies in preterm lambs aiming to assess the effect of viral sepsis on cardiorespiratory control in the presence of immaturity.

INTRODUCTION

Many respiratory viral pathogens, including coronaviruses, enterovirus, human metapneumovirus, influenza, parainfluenza, respiratory syncytial virus and rhinovirus, have been reported to cause late-onset sepsis (LOS) in preterm infants in the neonatal intensive care unit (Bennett et al., 2012; Santos et al., 2015; Cerone et al., 2017). Late-onset sepsis, a frequent complication in preterm infants, is often associated with severe cardiorespiratory events, which bear their own significant morbidity and mortality (Mayr et al., 2014; Singer et al., 2016; Shane et al., 2017). Typically, sepsis considered of bacterial origin until proven otherwise, but bacterial cultures frequently return negative (Gupta et al., 2018). Recognition of respiratory viral infections is challenging, due to the wide range of clinical manifestations, which often are similar to bacterial infections (Gagneur et al., 2008; Cerone et al., 2017). Viruses may hence be important causative agents of culture-negative sepsis. Early recognition of viral sepsis is of high clinical importance to prevent the adverse effects of antibacterial treatment, prevent subsequent antibacterial resistance and reduce length of hospital stay (Lin et al., 2018; Gupta et al., 2018).

Moreover, viruses such as rhinoviruses, influenza virus and respiratory syncytial virus can be responsible for severe apneas and bradycardias in the first weeks of life, not only in preterm, but also in full-term infants (Schroeder et al., 2013; Rudd et al., 2015; Cerone et al., 2017). They have also been implicated in sudden infant death syndrome (Blood-Sieffried, 2009; Carlin et al., 2017).

Polyinosinic: polycytidylic acid (Poly I:C), a Toll-like receptor (TLR)-3 synthetic ligand mimics infections due to these viruses. Previous experimental studies have used Poly I:C to assess various aspects of viral sepsis in adult rats (Chuang et al., 1990; Fortier et al., 2004), mice (Hiramoto et al., 1991), rabbits (Krueger et al., 1988; Soszynski et al., 1991; Kimura et al., 1994), guinea pigs (Cooper et al., 1988), and rhesus monkeys (Bauman et al., 2014). They have focused on acute-phase reaction, fever, sickness behaviors and pyrogenic properties after a central or systemic injection of Poly I:C. To our knowledge, the cardiorespiratory

alterations observed in response to Poly I:C injection have not been previously assessed, and no studies using Poly I:C to mimic viral sepsis have been performed in the neonatal period. The main goal of the present study was hence to use Poly I:C injection to set up a full-term newborn lamb model of viral sepsis and to characterize the cardiorespiratory alterations observed during the first six hours following this injection. A second goal was to provide preliminary results in four additional lambs as proof of principle that brainstem inflammation may be responsible for the alterations in cardiorespiratory control that we observed in our neonatal ovine model of Poly I:C injection.

MATERIAL AND METHODS

The protocol of the study was approved by the Ethics Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke (protocol # 409-16) and was carried out in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care. Twelve full-term, male mixed-bred lambs, aged 2-4 days and weighing 3.3 ± 0.5 kg (range: 2.6-4.2 kg), were included in the study. More precisely, eight lambs were used for the systemic inflammation induced by Poly I:C injection and four additional control lambs were used for the brainstem inflammation preliminary study.

Chronic instrumentation and recording equipment

Chronic surgical instrumentation was performed under local anesthesia with 2% lidocaine and conscious sedation using ketamine 5 mg/kg, preceded by anafen 3 mg/kg + atropine sulfate 0.1 mg/kg. Surgical instrumentation consisted in the insertion of a catheter into the left carotid artery for monitoring systemic arterial blood pressure and for sampling arterial blood to measure blood gases. General anesthesia was not used in order to avoid its effects on heart rate and respiratory rate variability (Venet et al., 2018). Antibiotics (ampicillin 50 mg and tobramycine 5 mg/kg) were also injected intramuscularly before anesthesia and once a day throughout the study.

The instrumentation was completed immediately before the experiments with i) subcutaneous needle electrodes for electroencephalogram (EEG), electrooculogram (EOG) and electrocardiogram (ECG) recordings; ii) elastic bands on the chest and abdomen to record lung volume variations semi-quantitatively via respiratory inductance plethysmography; iii) a pulse oximeter probe at the base of the tail to record oxygen hemoglobin saturation (SpO₂); iv) a rectal probe to record body core temperature. Physiological signals were transmitted wirelessly using our custom-designed radiotelemetry

system (Samson et al., 2011) and continuously recorded on a PC using the AcqKnowledge software (version 4.1, Biopac Systems, Montreal, Canada).

Design of the study

All lambs were housed in a Plexiglas chamber whose dimensions were in accordance with standards of the Canadian Council on Animal Care. They were able to move and feed *ad libitum* from a custom-built lamb feeder (Duvareille et al., 2010). As previously described (Porée et al, 2014), an infrared video camera was positioned above the Plexiglas chamber to continuously monitor locomotor activity of the animals throughout the experiment.

Main objective of the study

Neonatal ovine model of systemic inflammation induced by Poly I:C injection

Systemic inflammation was induced by an intravenous injection of Poly I:C (InvivoGen, San Diego, CA, USA), a classical agonist of the Toll-like receptor type 3 (TLR3), which is involved in rhinovirus infections, influenza viruses and respiratory syncytial viruses infections (Rudd et al., 2005).

After a postoperative recovery period of 24h, two 6-hour polysomnography recordings were performed on nonsedated lambs on two consecutive mornings. During the first experimental day, each lamb received an intravenous bolus of 10 mL of normal saline solution (control condition), whereas 10 mL of Poly I:C (300 µg/kg) was administered on the second day (Poly I:C condition). Arterial blood gases were measured at baseline and at time 3 hours and 6 hours. After completion of the recording. Euthanasia was performed by an IV injection of 90 mg/kg of pentobarbital sodium.

Data analysis

Video analysis of locomotor activity

The activity index, the total distance traveled and the percentage of time the animal was active throughout the recordings were calculated using a custom-built software as previously described (Nault et al., 2020).

States of alertness

Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define quiet and active wakefulness, as well as non-rapid eye movement (NREM) and rapid eye movement (REM) sleep (Renolleau et al., 1999).

Cardiac and respiratory function

Respiratory movements, ECG and arterial blood pressure were continuously recorded for a period of 6 hours during both control and viral sepsis conditions. The following variables were calculated every 15 min: i) respiratory frequency (f_R) averaged on 60 seconds, and heart rate (HR) and arterial pressure (MAP) averaged on 30 seconds; ii) the number of apneas (defined as at least two missed breaths) and total apnea duration; iii) the number of cardiac decelerations (defined as a decrease in HR greater than 30% lasting less than 5 seconds); iv) the number of bradycardias (defined as cardiac decelerations lasting at least 5 seconds).

Heart-rate and respiratory-rate variability

Heart-rate and respiratory-rate variability analysis were performed as previously described (Nault et al., 2020). Briefly, our semiautomated processing approach, previously developed using Matlab R2013a software (The MathWorks Inc., Natick, Mass., USA), was applied on the ECG and respiratory signals (Al-Omar et al., 2018). Each 6-hour recording was automatically processed to extract all the 2-minute stationary periods, which were considered to reflect the changes in autonomic state, according to previously proposed criteria (Borngat, 2010). QRS complexes were then automatically detected as the maximum

above a manually fixed threshold. The quality of each RR (cardiac-cycle length) series obtained was checked manually and corrected when necessary.

Preliminary studies on brainstem inflammation

Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR.

Preliminary studies on brainstem inflammation were performed on four of the lambs from the main objective, 6 hours after Poly I:C injection, and on four additional control lambs, 6 hours after saline injection as previously described (Nault et al., 2020).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with the help of the biostatistics department of our research center. Values were expressed as median (Q1, Q3). Statistical analyses were performed on raw data for all dependent variables. The Wilcoxon signed rank test was used to assess the effect of Poly I:C injection on rectal temperature, locomotor activity, states of alertness, apnea number, total apnea duration, cardiac deceleration and bradycardia number and total cardiac deceleration duration. A similar analysis was also performed on the dependent variables computed for HRV, RRV and cardiorespiratory interrelations. All analyses was performed with SPSS Statistics for Windows (version 25, Armonk, NY, USA).

In addition, mixed models were used to evaluate the association between independent variables (recording time point, temperature and Poly I:C injection) and each outcome variable (respiratory frequency, heart rate and mean arterial pressure). Since multiple measurements were made in each lamb, a random effect on intercept and a first-order autoregressive structure of the residuals were specified in the covariance structure of the mixed models. Linear, quadratic and cubic associations were studied for time and temperature, considering each day separately, and included in the multivariable models if

significant. Models were obtained from PROC MIXED in SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Main objective of the study

Body core temperature

Contrarily to the control condition, Poly I:C injection induced a biphasic increase in body core temperature in all lambs with a first peak at approximately 45 min ($\Delta T = 1^\circ\text{C}$; $p = 0.04$), followed by a second, longer and more sustained increase peaking around 150 min ($\Delta T = 1.3^\circ\text{C}$; $p = 0.03$). Thereafter, body core temperature gradually decreased back to baseline level around 4h30 post-Poly I:C injection (Figure 1).

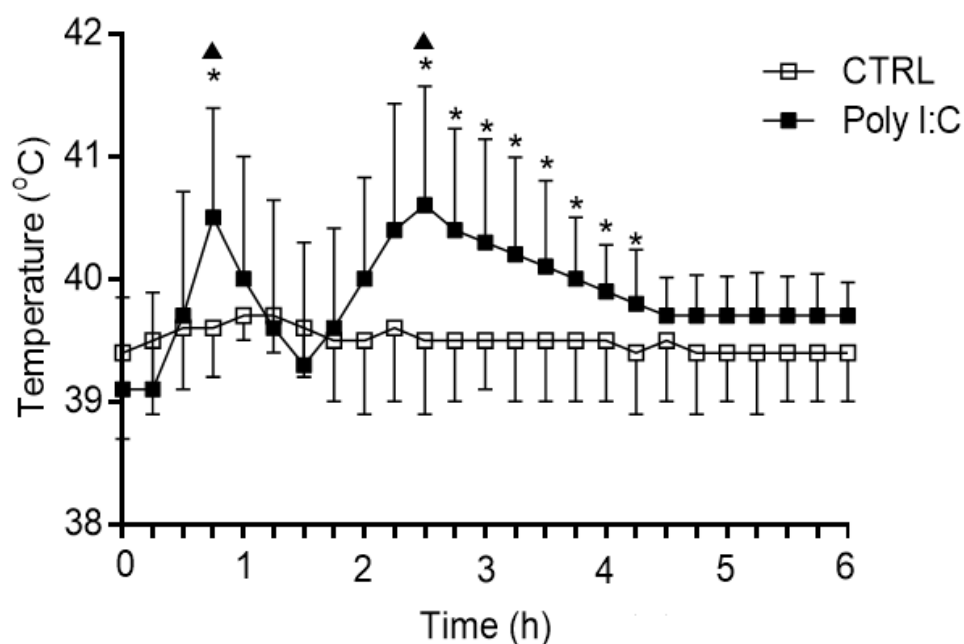


Figure 1. Variation of body core temperature after intravenous injection of Poly I:C. Poly I:C induced a biphasic increase in rectal temperature in newborn lambs. ▲: peaks of temperature. Results are illustrated as mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs. control condition (CTRL).

Locomotor activity

Video analysis ($n = 7$) revealed that Poly I:C injection markedly decreased the total distance traveled [46.3 (43.1, 70.6) vs. 108.3 (82, 142.9) m, $p = 0.02$] (Figure 2A) and the percentage of time the animal was active [0.9 (0.8, 1.3) vs. 1.8 (1.5, 2.9) %, $p = 0.03$] (Figure 2B) compared to the control condition. The decrease in total distance traveled per hour of recording after Poly I:C injection did not however reach significance compared to the control condition (p between 0.06 and 0.4) (Figure 2C).

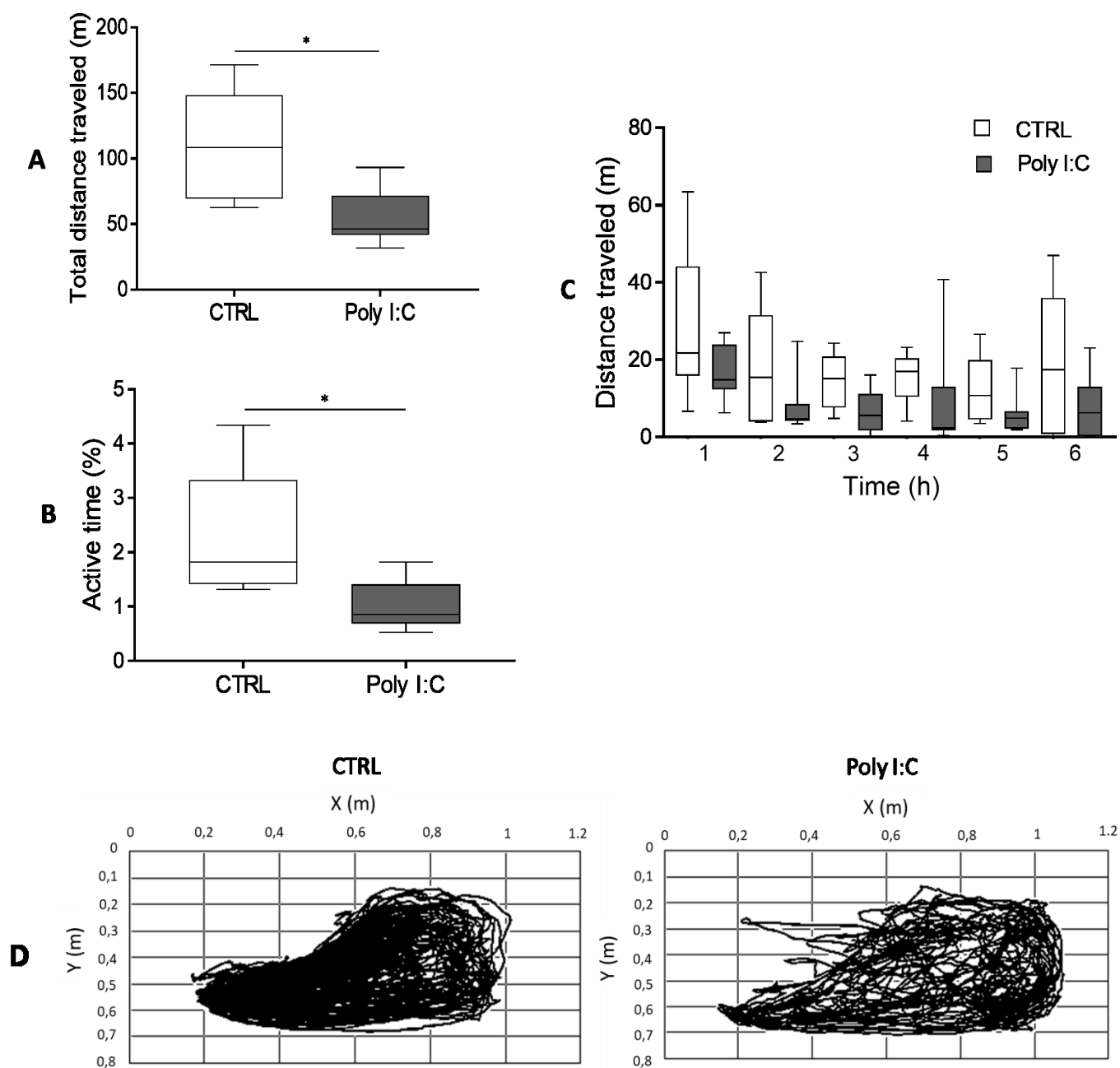


Figure 2. Video analysis of locomotor activity. The total distance traveled (**A**) as well as the percentage of time the animal was active (**B**) were significantly decreased during Poly I:C vs. control condition during the 6h-recordings. No statistical differences were noted for the total distance traveled per hour of recording (**C**) between conditions. In (**D**), an example of trajectory plots in one lamb for control and Poly I:C conditions. Results are illustrated as median (Q1, Q3), * $p < 0.05$ vs. control condition (CTRL).

States of alertness

Poly I:C injection significantly increased the percentage of recording time spent in NREM sleep [25 (21, 28) vs. 18 (12, 21) %, $p = 0.01$] and significantly decreased the percentage of time spent in active wakefulness [11 (9, 12) vs. 21 (13, 25) %, $p = 0.01$] compared to the control condition. No statistical differences were noted for quiet wakefulness [60 (48, 61) vs. 53 (49, 58) %, $p = 0.4$] and REM sleep [5 (3, 7) vs. 6 (4, 7) %, $p = 0.5$] between the Poly I:C and the control condition.

Arterial blood gases

Arterial blood gases ($n = 7$) revealed that PaO_2 at 6-hour time point was significantly increased [91 (87, 100) vs. 71 (58, 103) mmHg, $p = 0.04$] after Poly I:C injection compared to the control condition. No statistical differences were observed for PaCO_2 , pH and HCO_3^- between conditions (Table 1).

Table 1. Arterial blood gases for each condition.

Results are presented as median (Q1, Q3) at time 0 ($T = 0$), 3 hours ($T = 3$) and 6 hours ($T = 6$) after Poly I:C injection. PaCO_2 , partial pressure of carbon dioxide in arterial blood; PaO_2 , partial pressure of oxygen in arterial blood, HCO_3^- , bicarbonate concentration in arterial blood. * $p < 0.05$ vs. control condition.

	T = 0	T = 3	T = 6	T = 0	T = 3	T = 6
	Control $n = 7$			Poly I:C $n = 7$		
PaO_2 (mmHg)	91 (80, 99)	71 (58, 103)	97 (87, 99)	88 (80, 89)	91 (87, 100)*	92 (86, 96)
PaCO_2 (mmHg)	38 (33, 40)	40 (39, 40)	38 (34, 43)	35 (28, 39)	36 (33, 37)	35 (34, 39)
pH	7.45 (7.41, 7.48)	7.44 (7.43, 7.45)	7.47 (7.46, 7.49)	7.45 (7.42, 7.47)	7.44 (7.43, 7.50)	7.47 (7.46, 7.50)
HCO_3^- (mmol/L)	24 (23, 29)	21 (21, 26)	24 (24, 26)	24 (23, 25)	25 (25, 26)	27 (26, 30)

Effect of Poly I:C injection on cardiorespiratory control system

Respiratory activity. Overall, when averaged over the 6-hour recording, no significant change was observed in f_R [52 (49, 58) vs. 55 (51, 56).min⁻¹, $p = 0.9$] between the Poly I:C and the control condition (Figure 3A). However, a significant relationship was found between f_R and temperature so that the biphasic time-course of f_R variations followed that of temperature; for each increase of one degree in temperature, the f_R increased by 7.4 breaths per minute ($p < 0.0001$) (Figure 3A). In addition, the number [8 (3, 31) vs. 21 (7, 37), $p = 0.08$] and the total duration of apneas [38 (16.1, 132.7) vs. 85.8 (27.3, 202.7) s, $p = 0.1$] were not different between the Poly I:C and the control condition respectively (Figure 4A). Furthermore, no change in RRV was observed after Poly I:C injection.

Cardiac activity. Overall, conversely to f_R , Poly I:C injection significantly increased the mean HR compared to the control condition [254 (244, 268) vs. 183 (180, 195) .min⁻¹, $p = 0.001$] (Figure 3B). Similarly to f_R , the biphasic time-course of HR variations followed that of temperature; hence, for each increase of a degree in temperature the HR increased by 17 beats per minute ($p < 0.0001$).

Moreover, the number [53 (25, 72) vs. 81 (23, 127) $p = 0.3$] and the total duration of cardiac decelerations [31.6 (16.7, 60.5) vs. 65.7 (22, 96) s, $p = 0.2$] were not different between the Poly I:C and the control condition respectively (Figure 4B). No bradycardia superior to 5 seconds was observed in either condition. Alteration of HRV was observed after Poly I:C injection (Table 2).

Mean systemic arterial blood pressure. Overall, no significant difference was observed for the MAP [64.7 (63.6, 65.5) vs. 68.6 (66.9, 70.6) mmHg, $p = 0.4$] between the Poly I:C and the control condition; moreover, contrarily to HR and f_R , there was no significant relationship between MAP and temperature (Figure 4C).

Cardiorespiratory interrelations. A decrease in the magnitude of the respiratory sinus arrhythmia was observed, indicating a significant decrease in cardiorespiratory interactions (Table 2).

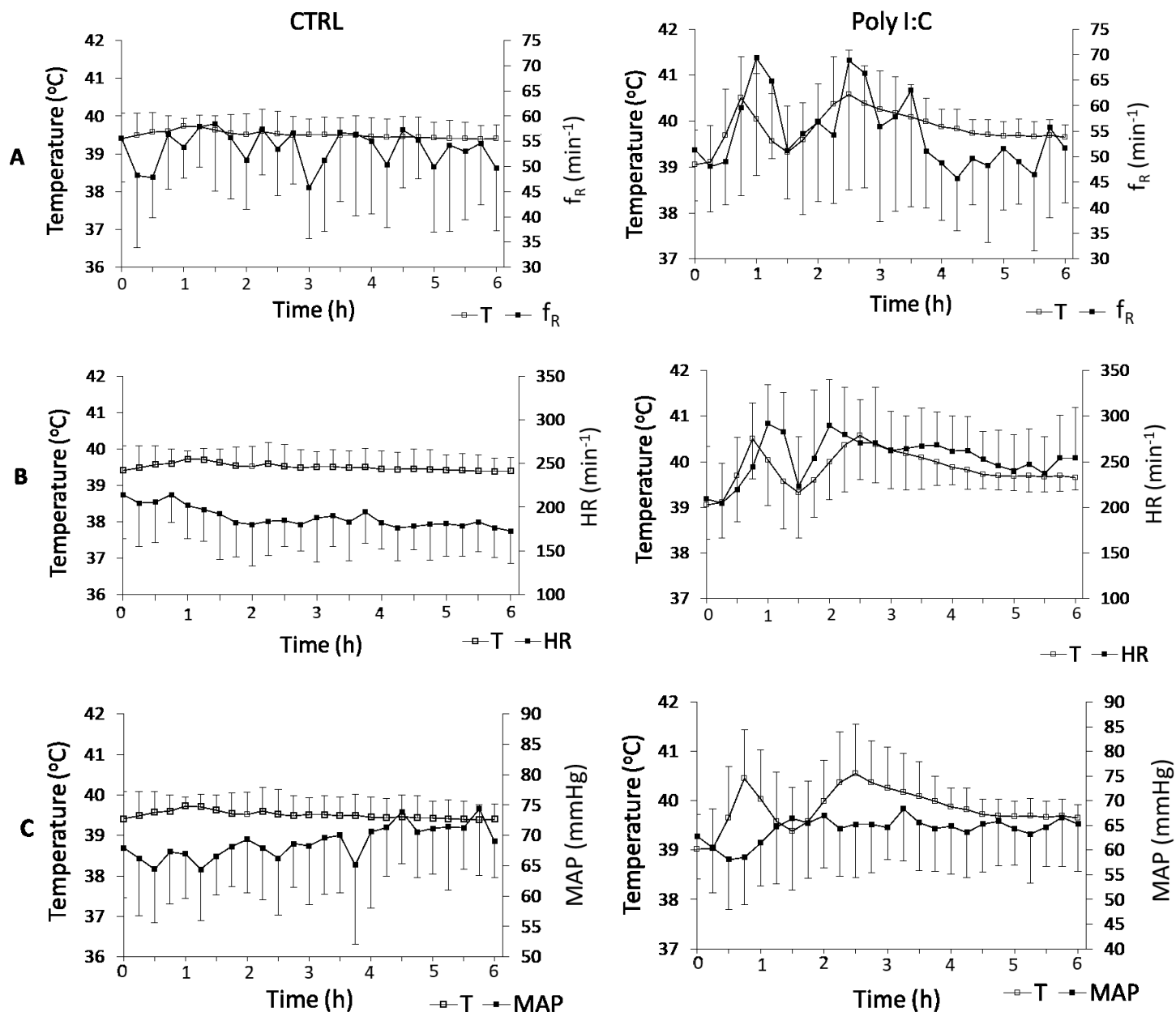


Figure 3. Effects of Poly I:C injection on heart rate, respiratory frequency and mean arterial pressure. No significant changes were observed for f_R between conditions and a significant relationship was found between f_R and temperature for Poly I:C condition (**A**). Poly I:C significantly increased heart rate compared to control condition and a significant relationship was found between heart rate and temperature for Poly I:C condition (**B**). No alterations were observed for MAP between conditions (**C**). Left panel: control condition (CTRL); right panel: Poly I:C condition. f_R , respiratory frequency; T, temperature; HR, heart rate; MAP, mean systemic arterial pressure. Results are illustrated as mean \pm SD.

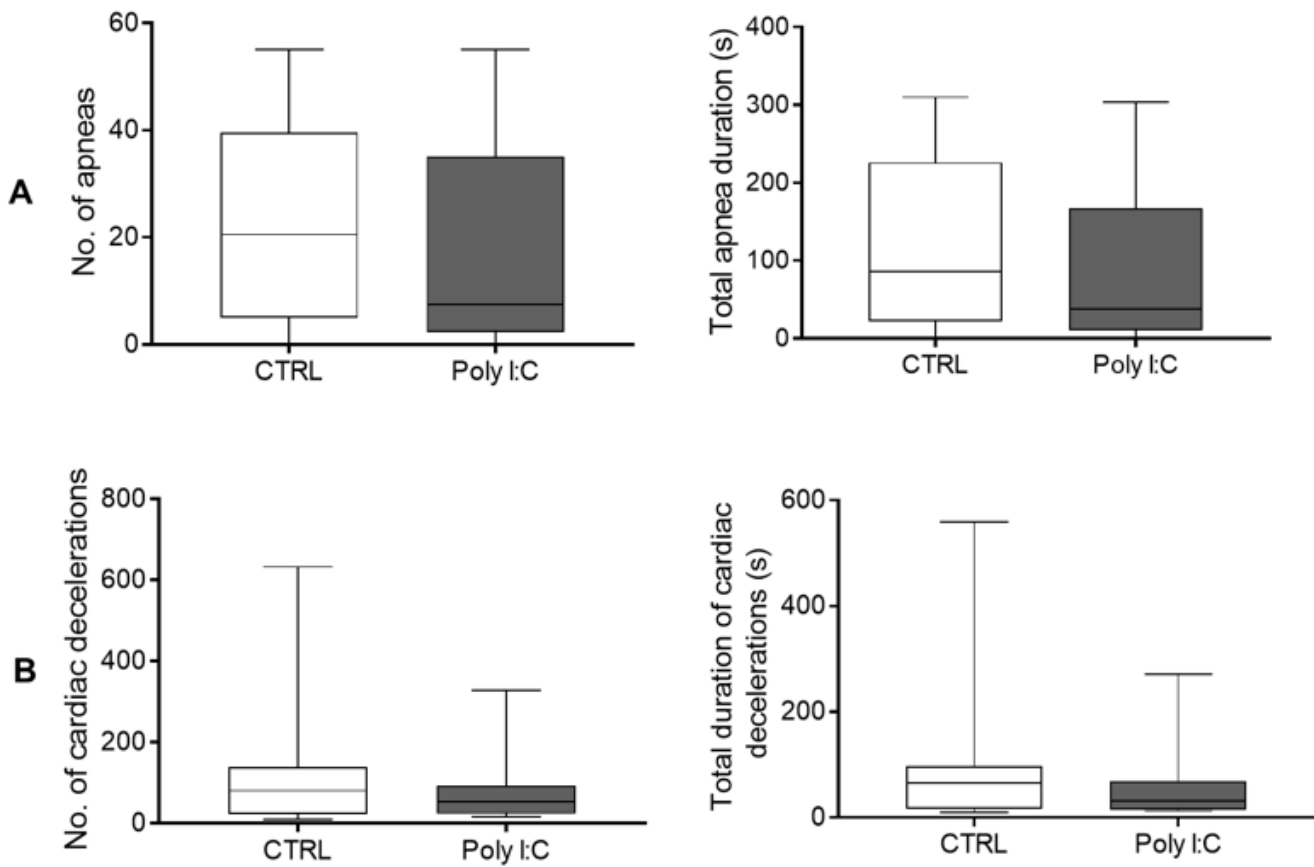


Figure 4. Effects of Poly I:C injection on apneas and cardiac decelerations. (A) Poly I:C injection did not change the number and the total duration of apneas. **(B)** Poly I:C injection did not change the number and the total duration of cardiac decelerations. No., number. Results are illustrated as median (Q1, Q3), * $p < 0.05$ vs. control condition (CTRL).

Table 2. Heart-rate and respiratory-rate variability observed in stationary conditions

Results are expressed as median (Q1, Q3). RR, cardiac-cycle length; Ttot (respiratory-cycle duration); Ti (inspiratory time); Te (expiratory time); SD (standard deviation); rMSSD (square root of the mean squared differences of successive RR intervals); SD1 (Poincaré plot short-term variability coefficient); SD2 (Poincaré plot long-term variability coefficient); HF (high frequency); LF (low frequency); SampEn (sample entropy); AC and DC (acceleration and deceleration capacities); α_1 [α_1 fractal coefficient (detrended fluctuation analysis)]; r^2 (Pearson's r^2 correlation coefficient); h_2 (nonlinear h_2 correlation coefficient); $V_{RR,RESP}$ (synchronization index); RSA (amplitude of respiratory sinus arrhythmia). The new variables used to describe vertical (V) and horizontal (H) visibility are the clustering coefficient [V-MD (vertical mean degree) and H-MD (horizontal mean degree)], the assortativity (V-assortativity and H-assortativity), and the transitivity (V-transitivity and H-transitivity) *: $p < 0.05$ for all lambs except one; **: $p < 0.05$ for all lambs.

N = 8	Control	Poly-IC at max	p value
RR (ms)	324 (289, 427)	223 (211, 247)	$< 10^{-6}$ **
Ttot (ms)	1160 (1040, 1380)	1140 (1010, 1490)	NS
Ti (ms)	540 (490, 600)	530 (470, 630)	NS
Te (ms)	620 (510, 780)	640 (540, 830)	NS
Ti/Ttot	0.54 (0.49, 0.6)		
HRV			
SD (ms)	12 (9, 16)	10 (6, 13)	$< 10^{-4}$
rMSSD (ms)	5 (2, 8)	2 (1, 7)	NS
SD1 (ms)	6 (4, 9)	3 (2, 5)	$< 10^{-6}$ *
SD2 (ms)	15 (11, 21)	14 (8, 18)	NS
HF ($10^3 \cdot \text{ms}^2$)	14.28 (7.4, 32.4)	5.45 (1.37, 17.24)	$< 10^{-3}$
LF ($10^3 \cdot \text{ms}^2$)	29.7 (18.5, 59.5)	24.7 (10.5, 41.1)	NS
LF/HF	2.15 (1.44, 3.61)	3.3 (1.8, 5.86)	$< 10^{-3}$
SampEn	0.11 (0.03, 0.21)	0.15 (0.07, 0.42)	$< 10^{-4}$ *
AC	0.38 (0.2, 0.62)	0.26 (0.06, 0.57)	NS
DC	0.46 (0.29, 0.78)	0.39 (0.16, 0.99)	NS
α_1	1.07 (0.97, 1.23)	1.2 (1.07, 1.35)	NS
V-MD			
V-assortativity			
V-transitivity			
H-MD			
H-assortativity			
H-transitivity			

RRV

SD Ttot (ms)	120 (90, 160)	150 (110, 210)	NS
SD1 Ttot (ms)	90 (70, 120)	120 (90, 150)	NS
SD2 Ttot (ms)	140 (100, 190)	160 (120, 250)	NS
SampEn Ttot	2.35 (2.21, 2.68)	2.6 (2.31, 3.22)	NS

Cardiorespiratory interrelations

r^2	0.03 (0.01, 0.07)	0.02 (0.01, 0.06)	NS
h_2	0.07 (0.05, 0.13)	0.06 (0.04, 0.1)	NS
$\gamma_{RR,RESP}$ (n.u.)	0.1 (0.06, 0.13)	0.1 (0.05, 0.13)	NS
RSA (ms)	11.3 (7, 15.7)	5.9 (2.9, 13)	$< 10^{-4}$

Preliminary results on brainstem inflammation

IL-6, IL-8, TNF- α and Caspase-3 mRNA expression. A tendency towards an increase in mRNA expression of the early onset inflammatory mediators IL-6, IL-8, TNF- α and Caspase-3 was observed 6 hours after Poly I:C injection in four lambs compared to four controls injected with saline (Figure 5).

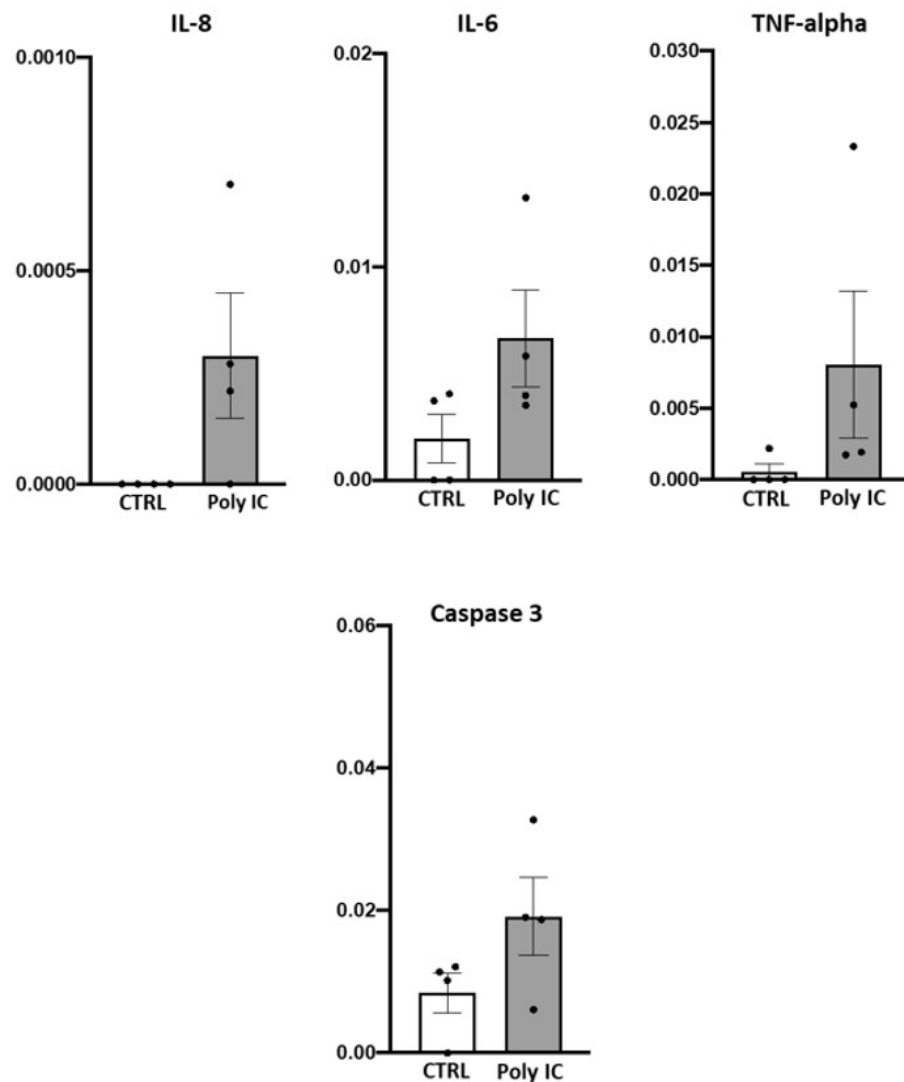


Figure 5. Assessment of brainstem inflammation following systemic Poly I:C injection Quantitative RT-PCR in whole brainstem tissue shows an increased IL-8, IL-6, TNF- α and Caspase-3 mRNA expression in Poly I:C-injected lambs compared to control lambs. Results are expressed as fold increase compared to an endogenous control (the housekeeping gene SDHA) and presented as mean \pm SD (n = 4 lambs per group).

DISCUSSION

The current study provides new observations on the physiological consequences of injecting Poly I:C to mimic a systemic inflammation related to a viral sepsis in a full-term newborn ovine model. The general effects of Poly I:C within the 6 hours following its injection included a biphasic increase in body core temperature and a decrease in locomotor activity and active wakefulness, as well as an increase in NREM sleep. Moreover, Poly I:C injection led to variations in both HR and f_R following a biphasic pattern paralleling temperature variations.

In addition, Poly I:C injection was responsible for an overall decrease in HRV. Finally, a tendency toward an increase in IL-6, IL-8, TNF- α and Caspase-3 mRNA expression at the level of the brainstem was observed 6 hours after Poly I:C injection.

Our neonatal ovine model of Poly I:C viral sepsis

Several respiratory viral pathogens, including coronavirus, enterovirus, human metapneumovirus, influenza, parainfluenza, respiratory syncytial virus and rhinovirus have been reported as possible causes of late-onset sepsis in the preterm infant in the neonatal intensive care unit (Gagneur et al, 2008; Cerone et al., 2017).

Most viruses produce double-stranded RNA at some point during their replication (Jacobs et Langland, 1996). Poly I:C is a synthetic viral double-stranded RNA analog and a TLR3 specific ligand that triggers antiviral responses of the innate immune system, hence mimicking a viral sepsis. Compared to live viruses, the use of Poly I:C has the advantages of safety, reproducibility and control over dose and time of administration (Fortier et al., 2004). TLR3 stimulation is especially involved in rhinovirus, influenza and respiratory syncytial virus infection (Schroeder et al., 2013; Rudd et al., 2015). The latter is often responsible for sepsis in the first weeks of life mainly presenting as severe apneas-

bradycardias (Schroeder et al., 2013; Rudd et al., 2015) and potentially sudden infant death syndrome (Blood-Siegfried, 2009; Carlin et Moon, 2017).

Little is known about viral sepsis and cardiorespiratory control alterations in the neonatal period. However, bacterial sepsis and cardiorespiratory alterations have been studied by our research team (Nault et al., 2020). Our findings reveal that systemic inflammation using LPS IV injection induces a biphasic increase in body core temperature and an overall increase in respiratory frequency, heart rate, and cardiac decelerations. Also, a decrease in locomotor activity and active wakefulness was observed in healthy full-term newborn lambs after LPS injection (Nault et al., 2020).

It is important to know that TLR signaling involves mostly two pathways: a MyD88-dependent pathway (common to all TLRs), which results in the activation of NF- κ B transcription factors involved in the expression of many pro-inflammatory genes, and a MyD88-independent pathway (peculiar to TLR3- and TLR4) involved in the expression of type I interferons (IFN α and IFN β) (Takeda et al., 2004; Jensen et Thomsen, 2012; Kawasaki et Kawai, 2014). As TLR-4 and TLR-3 activate the same pathways, cardiorespiratory alterations are expected to be similar between bacterial and viral sepsis, making recognition of viral sepsis challenging for clinicians. It is also known that the constitutional symptoms and clinical features of viral sepsis are frequently indistinguishable from bacterial or fungal sepsis (Gupta et al., 2018; Lin et al., 2018).

An extensive review of the literature revealed that there are only two studies using *in vivo* Poly I:C in a sheep model (Hillman et al., 2008; Dhanasekaran, 2013). The first study focused on the developmental changes in TLRs in a fetal sheep lung model (Hillman et al., 2008) while the second study uses Poly I: C to define the innate immune response caused by bluetongue virus in adult sheep and goats (Dhanasekaran, 2013).

Central or systemic administration of Poly I:C was rather studied with respect to acute-phase reaction, fever, sickness behaviors and pyrogenic properties in whole animal in a variety of species, including adult rats (Chuang et al., 1990; Fortier et al., 2004), mice

(Hiramoto et al., 1991), rabbits (Krueger et al., 1988; Soszynski et al., 1991; Kimura et al., 1994), guinea pigs (Cooper et al., 1988), and rhesus monkeys (Bauman et al., 2014). None of these studies however examined the effects of Poly I:C on cardiorespiratory control alterations.

Effect of Poly I:C administration on body core temperature

The doses of Poly I:C used in the literature are variable according to the species, from 0.25 µg/kg to 25 mg/kg (Cooper et al., 1988; Krueger et al., 1988; Chuang et al., 1990; Hiramoto et al., 1991; Soszynski et al., 1991; Kimura et al., 1994; Fortier et al., 2004; Bauman et al., 2014) and unknown in the newborn lamb. We selected a bolus of 300 µg/kg following pilot studies as the lowest dose of Poly I:C which induced cardiorespiratory alterations. This dose robustly mimicked a systemic inflammatory response in all lambs, as clearly shown by the biphasic increase in body core temperature at 45 and 150 min after injection. This biphasic increase in temperature is in agreement with previous results in rabbits (bolus 50 µg/kg Poly I:C) (Soszynski et al., 1991). On the contrary, monophasic fever was observed in rats (Chuang et al., 1990; Fortier et al., 2004), mice (Hiramoto et al., 1991), rabbits (Krueger et al., 1988; Kimura et al., 1994) and guinea pigs (Cooper et al., 1988). Differences between studies may be due to the animal model, route of administration and dose of Poly I:C used. As fever is one of the most common symptoms seen in septic children (Gupta et al., 2018), this elevation in body temperature appears to be an appropriate central inflammatory response to Poly I:C in our lamb model. Although very little is known about sickness behavioral responses to viral infection, one previous study in rats suggested that Poly I:C can induce fever via central neural mechanisms similar to those triggered by LPS in the hypothalamus (Fortier et al., 2004). Fever hence would result from the pyrogenic activity of inflammatory mediators (IL-1, IL-6, IFNs, and TNF-α) (Harris et al., 1987; Krueger et al., 2017; Gupta et al., 2018), which increase the synthesis of prostaglandin E2. The latter raises the set point of the thermoregulatory center in the hypothalamus, resulting in the elevation in core temperature (Harris et al., 1987; Gupta et al., 2018).

Effect of Poly I:C administration on locomotor activity and sleep states

In lambs, LPS induces fever and a variety of sickness behaviors, including decreased locomotor activity, drowsiness and increased sleep (Billiards et al., 2002; McClure et al., 2005; Nault et al., 2020). However, limited data are available on Poly I:C-induced clinical manifestations in newborn animals. In the current study, Poly I:C injection decreased lamb's locomotor activity and increased NREM sleep at the expense of active wakefulness. The mechanisms by which viruses may induce sleep are not well understood. Double-stranded RNA produced during viral replication might cause excessive sleep by direct toxic effects or by inducing interferon (INF- α) and pro-inflammatory cytokines production (ex. IL-1, TNF). The latter have somnogenic and pyrogenic properties (Shoham et al., 1987; Kueger et al., 1988; Krueger et al., 2017). This increase in NREM sleep in lambs is in agreement with study in adult rabbits that showed an increase in slow-wave sleep duration but an inhibition of REM sleep (Shoham et al., 1987; Krueger et al., 1988).

Effect of Poly I:C administration on cardiorespiratory control

The main focus of the current study was to investigate the effects of Poly I:C injection on neonatal cardiorespiratory control. To our knowledge, our research team is the first to study cardiorespiratory activity for several hours during a systemic inflammation mimicking a viral sepsis in a neonatal animal model. Our observations that both HR and f_R follow the biphasic increase in body core temperature are reminiscent of the various cardiorespiratory manifestations ranging from mild tachypnea and tachycardia to acute distress syndrome and shock in children with viral sepsis (Gupta et al., 2018).

Cardiac activity

No study has investigate the effect of Poly I:C on cardiac activity in a newborn animal. Overall, Poly I:C injection significantly increased HR compared to control condition. Again, this increase in HR can be explained by Poly I:C-induced synthesis of proinflammatory

cytokines (e.g., IL-6, IL-1 β , TNF- α) (Badke 2018), which have a sympathoexcitatory effect on the autonomic nervous system. This increase in HR after Poly I:C was similar to that with LPS (Nault et al., 2020). However, we did not observe any increase in short cardiac decelerations as we observed after LPS injection.

In addition, results herein show an overall decrease in HRV following injection of Poly I:C in term lambs.

Preliminary results on brainstem inflammation

The increased mRNA expression of IL-6, IL-8, TNF- α and Caspase-3 in the rostral ventrolateral medulla provides a proof of principle that Poly I:C can induce inflammation in the brainstem region containing cardiorespiratory centers in newborn lambs. This inflammation likely contributes to the alterations in cardiorespiratory control that we report herein. The interindividual variability in mRNA expression may be due to the variable delay between Poly I:C injection and the inflammatory response in the brain, similarly to our recent observations in newborn lambs following LPS-induced systemic inflammation (Nault et al., 2020). Of note, IL-8 and TNF- α mRNA expression does not seem different 6h after systemic injection of Poly I:C or LPS (Nault et al., 2020).

Study limitations

The main objective of the present study was to further characterize the cardiorespiratory alterations observed during 6 hours after Poly I:C injection in full-term newborn lambs, in an attempt to mimic a viral sepsis. Our neonatal model has limitations as a model of systemic inflammation related to viral sepsis. Indeed, Poly I:C did not induce bradycardias or apneas, a common clinical finding, which can reveal systemic infections (Bennett et al., 2012; Santos et al., 2015; Cerone et al., 2017). This is not surprising since apneas-bradycardias related with sepsis are less common in full-term than in preterm newborns, due to the general neural immaturity encompassing cardiorespiratory control (Santos et al., 2015; Lin et al., 2018). Accordingly, the current results pave the way for further studies in a

preterm lamb model of viral sepsis with immaturity of cardiorespiratory control system (Renolleau et al., 1999; St-Hilaire et al., 2007; Nault et al., 2017).

CONCLUSION

Respiratory viral infection is frequently underdiagnosed, unrecognized or infrequently studied as a cause of LOS in infants because of several challenges including the wide range of clinical manifestations and their similarity to bacterial infections (Cerone et al., 2017). Consequently, even if we did not find any major difference between bacterial and viral sepsis, our results are still important because they contribute to new knowledge on viral sepsis. Very little is known about HRV and RRV during viral sepsis in human newborns and this study is therefore the first to explore the cardiorespiratory variability when a viral sepsis is mimicked in a neonatal animal model.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the help of Marie-Pierre Garant, Biostatistics Division, Research Center of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CRCHUS).

REFERENCES

- Bauman MD, Iosif AM, Smith SE, Bregere C, Amaral DG, Patterson PH.** (2014). Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biol Psychiatry* 75(4): 332-341. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.06.025.
- Bennett NJ, Tabarani CM, Bartholoma NM, Wang D, Huang D, Riddell SW, Kiska DL, Hingre R, Rosenberg HF, Domachowske JB.** (2012). Unrecognized viral respiratory tract infections in premature infants during their birth hospitalization: a prospective surveillance study in two neonatal intensive care units. *J Pediatr* 161(5): 814-818. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.05.001.
- Beuchée A, Carrault G, Bansard JY, Boutaric E, Bétrémieux P, Pladys P.** (2009). Uncorellated randomness of the heart rate is associated with sepsis in sick premature infants. *Neonatology* 96(2):109-114. doi: 10.1159/000208792.
- Blood-Siegfried J.** (2009). The role of infection and inflammation in sudden infant death syndrome. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 31(4):516-523. doi: 10.3109/08923970902814137.
- Carlin RF, Moon RY.** (2017). Risk factors, protective factors, and current recommendations to reduce sudden infant death syndrome: A review. *JAMA Pediatr* 171(2): 175-180. doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.3345.
- Cerone JB, Santos RP, Tristram D, Lamson DM, Stellrecht KA, St George K, Horgan MJ, Rios A.** (2017). Incidence of respiratory viral infection in infants with respiratory syndroms evaluated for late-onset sepsis. *J Perinatol* 37(8): 922-926. doi: 10.1038/jp.2017.69.
- Chuang J, Lin MT, Chan SA, Won SJ.** (1990). Febrile effects of polyribonucleic acid: polyribocytidylic acid and interferon: relationship to somatostatin in rat hypothalamus. *Pflugers Arch* 415(5): 606-610. PMID:1691481.

Cooper KE, Blähser S, Malkinson TJ, Merker G, Roth J, Zeisberger E. (1988). Changes in body temperature and vasopressin content of brain neurons, in pregnant and non-pregnant guinea pigs, during fevers produced by Poly I:Poly C. *Pflugers Arch* 412(3): 292-296. PMID: 3186432.

Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. (2007). [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med Sci (Paris)* 23(1): 67-73. doi: 10.1051/medsci/200723167.

Dhanasekaran S, Vignesh AR, Raj GD, Reddy YK, Raja A, Tirumurugaan KG. (2013). Comparative analysis of innate immune response following in vitro stimulation of sheep and goat peripheral blood mononuclear cells with bluetongue virus – serotype 23. *Vet Res Commun* 37(4): 319-327. doi: 10.1007/s11259-013-9579-5.

Duvareille C, Beaudry B, St-Hilaire M, Boheimier M, Brunel C, Micheau P, Praud JP. (2010). Validation of a new automatic smoking machine to study the effects of cigarette smoke in newborn lambs. *Lab Anim* 44(4): 290-297. doi: 10.1258/la.2010.009124.

Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. (2004). The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1 dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(4): R759-R766. doi: 10.1152/ajpregu.00293.2004.

Gagneur, A., Vallet, S., Talbot, P. J., Legrand-Quillien, M.C., Picard, B., Payan, C., Sizun, J. (2008). Outbreaks of human coronavirus in a pediatric and neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr*. 167(12): 1427-1434. doi: 10.1007/s00431-008-0687-0.

Gupta N, Richter R, Robert S, Kong M. (2018). Viral sepsis in children. *Front Pediatr* 252(6). doi: 10.3389/fped.2018.00252 eCollection 2018.

Harris RL, Musher DM, Bloom K, Gathe J, Rice L, Sugarman B, Williams TW Jr, Young EJ. (1987). Manifestations of sepsis. *Arch Intern Med* 147(11): 1895-1906. PMID:3314762.

Hillman NH , Moss TJ, Nitsos I, Kramer BW, Bachurski CJ, Ikegami M, Jobe AH, Kallapur SG. (2008). Toll-like receptors and agonist responses in the developing fetal sheep lung. *Pediatr Res* 63(4): 388-393. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181647b3a.

Hiramoto RN, Ghanta VK, Rogers CF, Hiramoto NS. (1991). Conditioning the elevation of body temperature, a host defensive reflex response. *Life Sci* 49(2): 93-99. PMID: 2062174.

Jensen S, Thomsen AR. (2012). Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol* 86(6): 2900-2010. doi: 10.1128/JVI.05738-11.

Kawasaki T, Kawai T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461. eCollection 2014.

Kimura M, Toth LA, Agostini H, Cady AB, Majde JA, Krueger JM. (1994). Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *Am J Physiol* 267(6 Pt 2): R1596-605. doi:10.1152/ajpregu.1994.267.6.r1596.

Krueger JM, Majde JA, Blatteis CM, Endsley J, Ahokas RA, Cady AB. (1988). Polyribonucleosinic:polyribocytidylic acid enhances rabbit slow-wave sleep. *Am J Physiol* 225(5 Pt 2): R748-R755. doi: 10.1152/ajpregu.1988.255.5.r748.

Krueger JM, Majde JA. (2017). Microbial products and cytokines in sleep and fever regulation. *Crit Rev Immunol* 37(2-6): 291-315. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.70.

Lin GL, McGinley JP, Drysdale SB, Pollard AJ. (2018). Epidemiology and immune pathogenesis of viral sepsis. *Front Immunol* 9:2147. doi: 10.3389/fimmu.2018.02147. eCollection 2018.

Mayr FB, Yende S, Angus DC. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5(1): 4-11. doi: 10.4161/viru.27372.

Moscovis SM, Gordon AE, Al Madani OM, Gleeson M, Scott RJ, Hall ST, Burns C, Blackwell C. (2015). Virus infections and sudden death in infancy: The role of interferon- γ . *Front Immunol* 6:107. doi: 10.3389/fimmu.2015.00107. eCollection 2015.

Nault S, Creuze V, Al-Omar S, Levasseur Annabelle, Nadeau C, Samson N, Imane R, Tremblay S, Carrault G, Pladys P, Praud JP. (2020). Cardiorespiratory alterations in a newborn ovine model of systemic inflammation induced by lipopolysaccharide injection. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00585>.

Nault S, Samson N, Nadeau C, Djeddi D, Praud JP. (2017). Reflex cardiorespiratory events from esophageal origin are heightened by preterm birth. *J Appl Physiol* 123(2): 489-497. doi: 10.1152/japplphysiol.00915.

Porée F, Creuze V, Specq ML, Samson N, Praud JP, Carrault G. (2014). Non-invasive devices and methods for large animal monitoring using automated video processing. *IRBM* 35(4): 173-181. doi: 10.1016/j.irbm.2014.02.002

Raza MW, Blackwell CC. (1999). Sudden infant death syndrome, virus infections and cytokines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25(1-2): 85-96. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01330.x.

Renolleau S, Letourneau P, Niyonsenga T, Praud JP. (1999). Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apneas in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 159(5 Pt 1): 1396-1404, 1999. doi: 10.1164/ajrccm.159.5.9807088.

Rudd BD, Burstein E, Duckett CS, Li X, Lukacs NW. (2005). Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J Virol* 79(6): 3350-3357. doi: 10.1128/JVI.79.6.3350-3357.

Samson N, Dumont S, Specq ML, Praud JP. (2011). Radio telemetry devices to monitor breathing in non-sedated animals. *Respir Physiol Neurobiol* 179: 111-118. doi:10.1016/j.resp.2011.09.008.

Santos RP, Tristram D. (2015). A practical guide to the diagnosis, treatment, and prevention of neonatal infections. *Pediatr Clin North Am* 62(2): 491-508. doi: 10.1016/j.pcl.2014.

Schroeder AR, Mansbach JM, Stevenson M, Macias CG, Fisher ES, Barcega B, Sullivan AF, Espinola JA, Piedra PA, Camargo CA Jr. (2013). Apnea in children hospitalized with bronchiolitis. *Pediatrics* 132(5): e1194-1201. doi: 10.1542/peds.2013-1501.

Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. (2017). Neonatal sepsis. *Lancet* 390(10104): 1770-1780. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.

Shoham S, Davenne D, Cady AB, Dinarello CA, Krueger JM. (1987). Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep. *Am J Physiol* 253(1 Pt 2): R142-R149. doi: 10.1152/ajpregu.1987.253.1.r142.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal M, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. (2016). Third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8): 801-810 doi: 10.1001/jama.2016.0287.

Soszynski D, Kozak W, Szewczenko M. (1991). Course of fever response to repeated administration of sublethal doses of lipopolysaccharides, polyinosinic: polycytidylic acid and muramyl dipeptide to rabbits. *Experientia* 47(1): 43-47. PMID: 1999244.

St-Hilaire M, Samson N, Nsegbe E, Duvareille C, Moreau-Bussière F, Micheau P, Lebon J, Praud JP. (2007). Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol* 102(4):1429-1438. doi: 10.1152/japplphysiol.00977.

Takeda K, Akira S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16(1): 3-9. PMID:14751757.

Venet T, Pichot V, Charier D, Scalabre A, Patural H. (2018). Autonomic cardiac regulation after general anesthesia in children. *Paediatr Anaesth* 28(10): 881-887. doi: 10.1111/pan.1346.